

**Pengaruh Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.)  
Terhadap Hematologi, Mikronuklei dan Histologi Pada Ikan  
Nila (*Oreochromis niloticus*) Setelah Dipapar Pestisida  
Berbahan Aktif Metomil.**

**TESIS**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH :**

**R. Adharyan Islamy (156080100111001)**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2017**



TESIS

Pengaruh Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) Terhadap Hematologi, Mikronuklei dan Histologi Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Setelah Dipapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil.

Oleh :

R. Adharyan Islamy

156080100111001

Telah dipertahankan di depan penguji  
Pada tanggal  
29 Mei 2017  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Uun Yanuhar, SPI, MSi  
NIP. 19730404 200212 2 001

20 JUL 2017

Dr. Agus Maizar S. H., S.Pi, M.P  
NIP. 19720529 200312 1 001

20 JUL 2017

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Prof. Dr.Ir. Endang Yuli Herawati, MS  
NIP. 19570704 198403 2 001

20 JUL 2017

Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng, D.Sc  
NIP. 19790331 200501 1 003

20 JUL 2017

Mengetahui,

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



Dr. Ir. Happy Nusyam, MS  
NIP. 19600322 198601 1 001

20 JUL 2017



## IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **Pengaruh Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) Terhadap Hematologi, Mikronuklei dan Histologi Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Setelah Dipapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil.**

Nama Mahasiswa : R ADHARYAN ISLAM Y

NIM : 156080100111001

Program Studi : Budidaya Perairan

### PENGUJI PEMBIMBING:

Pembimbing 1 : Dr. Uun Yanuhar S.Pi. M.Si

Pembimbing 2 : Dr. Agus Maizar Suryanto H., S.Pi, M.P

### PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr.Ir. Endang Yuli Herawati, MS

Dosen Penguji 2 : Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng, D.Sc

Tanggal Ujian : 29 Desember 2017

## Ringkasan

R. Adharyan Islamy (156080100111001). **Pengaruh Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) Terhadap Hematologi, Mikronuklei dan Histologi Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Setelah Dipapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil.** Di bawah bimbingan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si dan Dr. Asus Maizar Suryanto H., S.Pi, MP.

Pestisida berbahan aktif metomil ( $C_5H_{10}N_2O_2S$ ), S-methyl-1-N-[(methylcarbamoyl)-oxy]-thioacetimidate secara global telah banyak digunakan di dunia pertanian karena aktifitas biologisnya yang luas, efisiensi dan toksisitas tinggi terhadap hama target. Efek ini tidak hanya akan dialami oleh organisme target namun juga organisme non target seperti ikan. Bahaya yang ditimbulkan akibat adanya paparan pestisida metomil terhadap ikan antara lain dapat menyebabkan keracunan yang bersifat akut hingga kematian.

Paparan Pestisida menyebabkan beberapa perubahan pada hematologi. Pestisida juga bersifat genotoksik dimana paparan pestisida mampu menyebabkan kerusakan dan ketidakstabilan kromosom atau kesalahan dalam proses mitosis sel dan berbagai penyimpangan selular lainnya yang dapat dilihat dari adanya mikronuklei pada sel darah. Secara jaringan, pestisida menyebabkan hipertrofi pada sel epitelial, hiperplasia, fusi pada lamella, nekrosis pada epitel insang, eosinofilik eksudat, penyusutan inti sel (*pycnotic nucleus*), meningkatkan adanya pulpa putih dan menurunkan adanya pulpa merah.

Untuk mengatasi beberapa dampak yang ditimbulkan oleh pestisida pada ikan, salah satunya dengan memanfaatkan bahan aktif dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp.). Ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) juga diketahui memiliki aktifitas antigenotoksik dan antimutagenik karena mampu menghambat terjadinya sejumlah abrasi kromosom, dan melindungi aktifitas mitotik sel. Selain itu, juga mampu menghambat fragmentasi DNA. Kandungan bahan aktif dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) ini juga mampu memperbaiki status kesehatan ikan. Pemberian rumput laut coklat terbukti mampu meningkatkan respon imun nonspesifik yang dapat dilihat dari parameter hematologi ikan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan konsentrasi letal pestisida berbahan aktif metomil terhadap status hematologi, mikronuklei dan histologi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan untuk mengetahui kemampuan antioksidan flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) terhadap status hematologi, mikronuklei dan histologi ikan (*Oreochromis niloticus*) yang terpapar konsentrasi letal pestisida berbahan aktif metomil.

Metode pada penelitian ini adalah metode eksperimen. Tahapan penelitian terdiri dari pengambilan Sampel Ikan Nila, uji toksisitas pestisida berbahan aktif metomil, pengolahan rumput Laut *Sargassum* sp., ekstraksi dan fraksinasi rumput laut coklat (*Sargassum* sp.), isolasi senyawa bioaktif flavonoid, paparan konsentrasi letal metomil dan pemberian flavonoid Rumput laut coklat (*Sargassum* sp.), pengambilan parameter hematologi, mikronuklei dan histologi serta kualitas air. Rancangan dan analisis data penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dimana ikan yang dipapar konsentrasi letal pestisida berbahan aktif metomil diberi 4 perlakuan dosis flavonoid dan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

**Kata Kunci :** Pestisida, Metomil, Flavonoid, Hematologi, Mikronuklei, Histologi.

## Summary

R. Adharyan Islamy (156080100111001). **Effect of Flavonoid from Brown Seaweed (*Sargassum* sp.) Against Haematology, Micronuclei and Histology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after Exposed by Methomyl-Based Pesticide.** Under the guidance of Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si and Dr. Asus Maizar Suryanto H., S.Pi, MP.

---

Methomyl-based pesticide (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S), S-methyl-1-N-[(methylcarbamoyl)-oxy]-thioacetimidate widely used because its biological activity, effectivity, and high toxicity against targets. That impact not only for the targets but will also have an impact on non targets organism like fish. It have toxic and deadly impact.

Exposure to Pesticides causes some changes to the hematology. Pesticides are also genotoxic in that exposure to pesticides is capable of causing chromosomal damage or instability or errors in the process of cell mitosis and other cellular deviations that can be seen from the presence of micronucleus in blood cells. In tissues, pesticides cause hypertrophy in epithelial cells, hyperplasia, fusion of lamellae, necrosis of the gill epithelium, eosinophilic exudate, shrinkage of the cell nucleus (pycnotic nucleus), increase the presence of white pulp and decrease the presence of red pulp.

To overcome some of the impacts caused by pesticides on fish, one of them by utilizing the active ingredients of brown seaweed (*Sargassum* sp.). Seaweed chocolate extract (*Sargassum* sp.) is also known to have antigenotoxic and antimutagenic activity because it inhibits the occurrence of a number of abrasion comosomes, and protects the cell mitotic activity. In addition, it is also able to inhibit DNA fragmentation. The content of the active ingredient of brown seaweed (*Sargassum* sp.) is also able to improve the health status of fish. The provision of brown seaweed proved able to increase nonspecific immune response that can be seen from the parameters of fish hematology.

The purpose of this research is to know the effect of exposure of lethal concentration of pesticide with active metomile on the status of hematology, micronuclei and histology of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and to know the ability of brown seaweed flavonoid antioxidant (*Sargassum* sp.) On hematology, mikronuklei and histology status of fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to lethal concentrations of pesticides with active metomyl.

Method in this research is experiment method. The research stages consist of sampling of Tilapia Fish, toxicity test of active pesticide metomile, *Sargassum* sp. Seaweed processing, extraction and fractionation of brown seaweed (*Sargassum* sp.), Isolation of flavonoid bioactive compound, exposure of lethal concentration of metomyl and flavonoid administration of brown seaweed (*Sargassum* sp.), Taking of hematology, micronuclei and histology parameters and water quality. The design and analysis of the research data used were simple Randomized Design (RAL) in which the fish exposed the concentration of lethal pesticide with active metomyl were given 4 doses of flavonoid treatment and performed 3 replications.

**Keywords :** Pesticide, Methomyl, Flavonoid, Haematology, Micronuclei, Histology.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Proposal Tesis dengan judul “Pengaruh Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) Terhadap Hematologi, Mikronuklei dan Histologi Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Setelah Dipapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil”.

Proposal Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mengikuti gelar Magister di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Penulis menyadari bahwa dalam Proposal Tesis ini masih terdapat banyak kekurangan. Akhirnya, semoga dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan perikanan khususnya bagi kami pribadi dan pembaca.

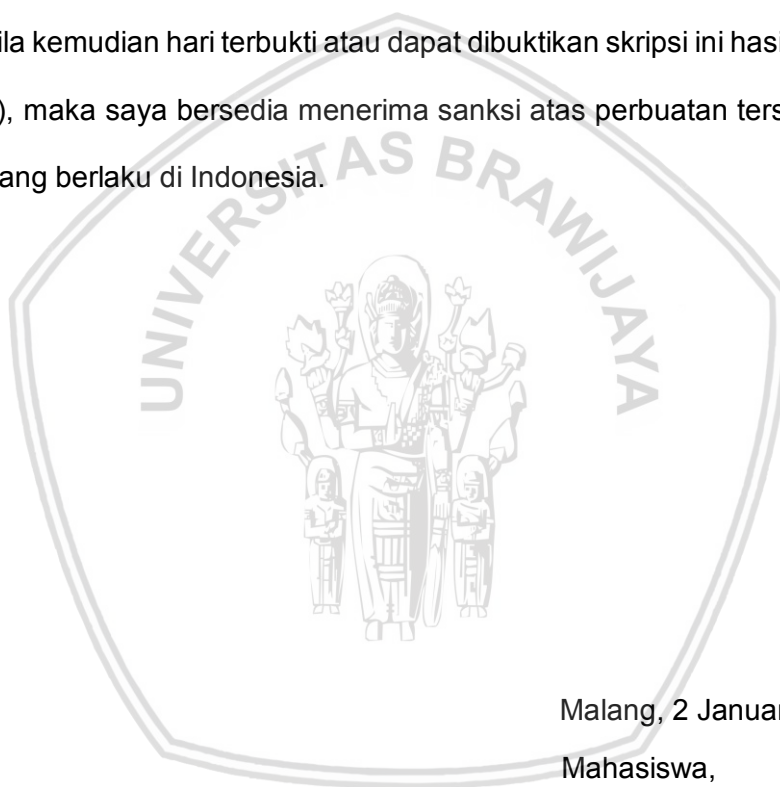
Malang, 26 Februari 2017

Penulis

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam laporan tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang menulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, 2 Januari 2018

Mahasiswa,

R. ADHARYAN ISLAMY  
NIM. 156080100111001

## Riwayat Hidup



Nama lengkap penulis, yaitu R. Adharyan Islamy, lahir di Pamekasan pada tanggal 18 Juni 1991. Adapun riwayat pendidikan penulis, yaitu pada tahun 2003 lulus dari SD Al-Irsyad Al-Islamiyyah Cabang Pamekasan dan pada 2006 lulus dari SMP Negeri 2 Pamekasan lalu pada 2009 lulus dari MAN Jungcanggang Pamekasan. Pada tahun 2013 lulus dari Universitas Brawijaya Malang di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Jurusan manajemen Sumberdaya perairan dan melanjutkan perkuliahan kembali dalam program Magister pada tahun 2015. Pada tahun 2015 penulis dipercaya menjadi asisten peneliti di Riset Grup ENFISHMO dan MOLEKULER AKUATIK hingga sekarang.

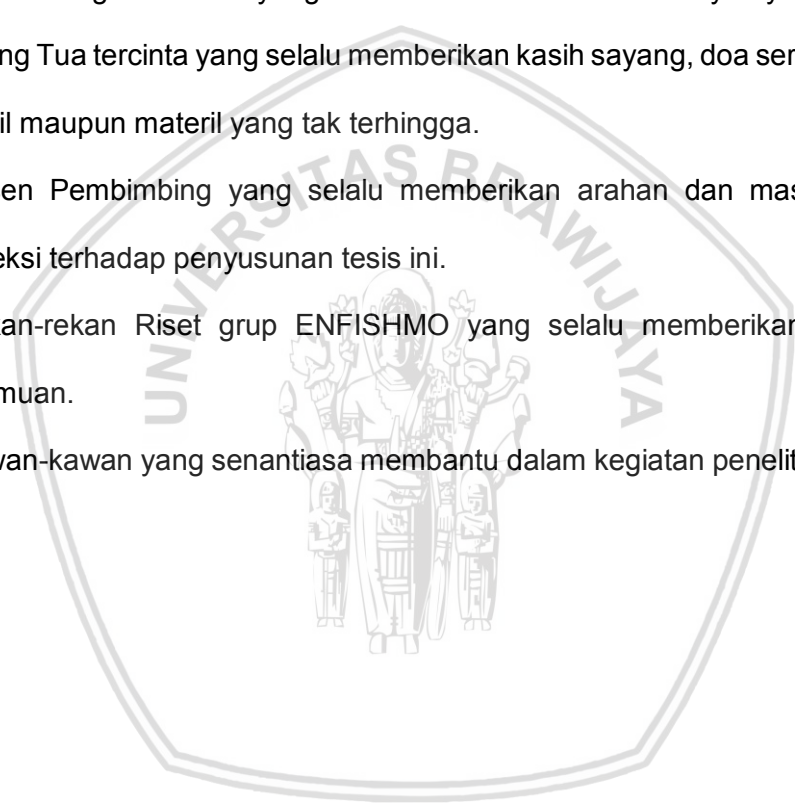
Dalam mengembangkan keilmuan dan pengalamannya, penulis selalu aktif dalam berbagai kegiatan seperti menjadi Tenaga Pendamping Program Pendampingan/Pengawalan Komoditas Tanaman Holtikultura, Tanaman Pangan, Tanaman Perkebunan dan Akseptor Ternak Tahun 2017, Enumerator dalam Penyusunan Evaluasi Akhir Pelaksanaan Program/Kegiatan Desa Mandiri Anggur Merah Tahun (2011-2017) Provinsi NTT.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Selama menyelesaikan penyusunan tesis ini penulis telah banyak bantuan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang turut membantu, khususnya :

1. Tuhan Yang Maha Esa yang selalu memberi ilmu dan hidayah yang besar.
2. Orang Tua tercinta yang selalu memberikan kasih sayang, doa serta dorongan moril maupun materil yang tak terhingga.
3. Dosen Pembimbing yang selalu memberikan arahan dan masukan serta koreksi terhadap penyusunan tesis ini.
4. Rekan-rekan Riset grup ENFISHMO yang selalu memberikan dukungan keilmuan.
5. Kawan-kawan yang senantiasa membantu dalam kegiatan penelitian tesis ini.



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>IDENTITAS PENGUJI .....</b>	<b>iii</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>viii</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan penelitian .....	4
1.4 Manfaat penelitian .....	4
1.5 Penelitian terdahulu.....	4
<b>2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1. Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	6
2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi .....	6
2.1.2. Habitat .....	7
2.1.3. Keunggulan ikan Nila .....	8
2.2. Pestisida .....	8
2.2.1. Pengertian Pestisida .....	8
2.2.2. Perjalanan Pestisida ke Perairan.....	9
2.3. Pestisida Metomil .....	10
2.3.1. Pengertian Pestisida Metomil .....	10
2.3.2. Sifat Pestisida Metomil .....	11
2.3.3. Dampak Pestisida Metomil .....	11
2.4. Genotoksik.....	13
2.4.1. Pengertian Genotoksik .....	13
2.4.2. Mekanisme Pestisida Dalam Tubuh Ikan .....	14
2.4.3. Mekanisme dan Dampak Terjadinya Genotoksik .....	15
2.5. Sistem Imun Pada Ikan .....	16

2.6.	Sistem Imun Ikan Terhadap Paparan Pestisida .....	16
2.7.	Rumput Laut Coklat <i>Sargassum</i> sp. ....	17
2.7.1.	Klasifikasi dan Morfologi <i>Sargassum</i> sp. ....	18
2.7.2.	Habitat <i>Sargassum</i> sp. ....	19
2.7.3.	Kandungan Bioaktif <i>Sargassum</i> Sp. ....	19
2.8.	Flavonoid .....	20
2.8.1.	Pengertian Flavonoid .....	20
2.8.2.	Struktur dasar senyawa flavonoid .....	21
2.8.3.	Kelarutan Flavonoid .....	22
2.9.	Ekstraksi dan Pemisahan Senyawa .....	23
2.9.1.	Ekstraksi .....	23
2.9.2.	Pemisahan Senyawa .....	25
2.10.	Mikronuklei .....	25
2.11.	Hematologi .....	27
2.11.1.	Hematokrit .....	27
2.11.2.	Hemoglobin (Hb) .....	28
2.11.3.	Eritrosit .....	28
2.11.4.	Leukosit .....	29
2.12.	Histologi Jaringan Ikan .....	29
<b>3</b>	<b>KERANGKA PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
3.1.	Landasan teori .....	30
3.2.	Kerangka Konseptual Penelitian .....	31
3.3.	Kerangka Operasional Penelitian .....	32
3.4.	Hipotesis .....	33
3.5.	Strategi Publikasi .....	33
<b>4</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Pendekatan Penelitian .....	34
4.2.	Prosedur Penelitian .....	34
4.2.1.	Pengambilan Sampel Ikan Nila .....	34
4.2.2.	Uji Toksisitas Pestisida Berbahan Aktif Metomil .....	34
4.2.3.	Pengolahan Rumput Laut <i>Sargassum</i> sp. ....	37
4.2.4.	Ekstraksi rumput laut coklat ( <i>Sargassum</i> sp.) .....	38
4.2.5.	Uji Fitokimia .....	39
4.2.6.	Pengukuran Total Flavonoid .....	40
4.2.7.	Isolasi Senyawa Flavonoid .....	41
4.2.8.	Uji IC <sub>50</sub> Flavonoid .....	43
4.2.9.	Perlakuan Pemberian Pestisida dan Flavonoid .....	43
4.3.	Parameter Hematologi .....	44
4.3.1.	Hematologi .....	44
4.3.2.	Pengukuran total eritrosit (TE) .....	44
4.3.3.	Pengukuran Kadar Hemoglobin (Hb) .....	45



4.3.4.	Pengukuran Kadar Hematokrit (Hc) .....	45
4.3.5.	Pengukuran Total Leukosit (TL) .....	46
4.4.	Parameter Histologi Ikan Nila .....	46
4.4.1.	Prosedur Pembuatan Preparat Histologi .....	46
4.5.	Uji mikronukleus pada darah ikan.....	48
4.6.	Parameter Penunjang .....	48
4.6.1.	Suhu .....	49
4.6.2.	Derajat Keasaman (pH) .....	49
4.6.3.	Oksigen terlarut (DO) .....	49
4.6.4.	Total Amonia Nitrogen (TAN) .....	49
4.7.	Rancangan Percobaan .....	50
4.8.	Variabel Penelitian .....	51
4.9.	Analisis Data .....	51
4.10.	Jadwal penelitian.....	52
<b>5.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>53</b>
5.1.	Uji Toksisitas .....	53
5.1.1.	Uji Penentuan Kisaran ( <i>range finding test</i> ) .....	53
5.1.2.	Uji Definitif (LC <sub>50</sub> ).....	54
5.2.	Ekstraksi Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum sp.</i> ).....	56
5.3.	Uji Fitokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum sp.</i> ) .....	58
5.4.	Kadar Total Senyawa Flavonoid Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum sp.</i> ).....	59
5.5.	Uji Aktifitas Antioksidan .....	60
5.6.	Parameter Hematologi Ikan .....	61
5.6.1.	Eritrosit.....	61
5.6.2.	Hematokrit .....	63
5.6.3.	Hemoglobin .....	64
5.6.4.	Leukosit .....	66
5.7.	Parameter Mikornukei Ikan Nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	68
5.8.	Parameter Histologi Insang Ikan Nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	70
5.8.1.	Histologi Insang Ikan Nila Tanpa Perlakuan.....	71
5.8.2.	Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Dengan Konsentrasi LC50 Selama 96 Jam. ....	72
5.8.3.	Skoring Kerusakan Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Dengan Konsentrasi LC50 Selama 96 Jam.....	73
5.8.4.	Gambaran Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum sp.</i> ).....	76

5.8.5. Skoring Kerusakan Pada Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum sp.</i> ).....	77
5.9. Paramter Penunjang .....	80
5.9.1. Suhu .....	80
5.9.2. Derajat keasaman (pH) .....	81
5.9.3. Oksigen Terlarut (DO) .....	82
5.9.4. Total Amonia Nitrogen (TAN).....	83
<b>6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>85</b>
6.1. Kesimpulan .....	85
6.2. Saran .....	85
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>86</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>98</b>



## DAFTAR TABEL

Table 1. Penelitian terdahulu .....	4
Table 2. Beberapa pelarut organik beserta sifat fisiknya .....	24
Tabel 3. Strategi Publikasi .....	33
Table 4. Variasi Konsentrasi Progresif bahan pencemar pada skala logaritmik. ....	36
Tabel 5. Tabel Rancangan Percobaan.....	50
Tabel 6. Jadwal Rencana Penelitian .....	45
Tabel 7. Berat Kering Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum</i> sp.).....	56
Tabel 8. Redemen Ekstrak Rumput laut Coklat ( <i>Sargassum</i> sp.) .....	57
Tabel 9. Analisa uji fitokimia ekstrak rumput laut coklat ( <i>Sargassum</i> sp) .....	58
Tabel 10 Kadar flavonoid rumput laut coklat ( <i>Sargassum</i> sp.) dengan metode $AlCl_3$ .....	59
Tabel 11. Rata-Rata Skoring Kerusakan Jaringan pada Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil .....	73
Tabel 12. Rata-Rata Skoring Tingkat Kerusakan Jaringan pada Insang Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum</i> sp.).....	78
Tabel 13. Rata-rata suhu selama masa pemaparan pestisida berbahan aktif metomil.....	81
Tabel 14. Rata-rata pH Selama Masa Pemaparan Pestisida Berbahan Aktif Metomil .....	82
Tabel 15. Konsentrasi DO Selama Masa Pemaparan Pestisida Berbahan Aktif Metomil .....	83
Tabel 2 . Konsentrasi TAN ( <i>Total Ammonia Nitrogen</i> ) Media Pemeliharaan Selama Masa Pemaparan Pestisida Berbahan Aktif Metomil .....	83



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	6
Gambar 2. <i>Sargassum</i> Sp. ....	19
Gambar 3. Kerangka dasar senyawa flavonoid .....	22
Gambar 4. Kerangka Konseptual Penelitian .....	31
Gambar 5. Kerangka Operasional Penelitian.....	32
Gambar 6 grafik mortalitas ikan selama uji penentuan kisaran .....	53
Gambar 7. grafik mortalitas ikan selama uji definitive .....	54
Gambar 8 Ekstrak <i>Sargassum</i> sp.....	57
Gambar 9 Aktivitas antioksidan rumput laut coklat ( <i>Sargassum</i> sp.) .....	60
Gambar 10. Grafik kadar eritrosit pada ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	62
Gambar 11. Grafik kadar hematokrit pada ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	64
Gambar 12. Grafik kadar hemoglobin pada ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	65
Gambar 13. Grafik kadar leukosit pada ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	67
Gambar 14. Sel perifer eritrosit ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	68
Gambar 15. Grafik frekwensi mikronuklei ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	69
Gambar 16 Gambaran histologi insang ikan Nila tanpa perlakuan .....	71
Gambar 17 gambaran histologi insang ikan nila yang terpapar pestisida berbahan aktif metomil dengan konsentrasi LC50 selama 96 jam .....	72
Gambar 18. Gambaran Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum</i> sp.).....	76

## 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pestisida berbahan aktif metomil ( $C_5H_{10}N_2O_2S$ ), S-methyl-1-N-[(methylcarbamoyl)-oxy]-thioacetimidate adalah pestisida dari golongan karbamat yang secara global telah banyak digunakan untuk melindungi tanaman pertanian karena aktifitas biologisnya yang luas (Guo, 2006; Meng, 2014). Metomil memiliki efisiensi dan toksisitas tinggi yang mampu membunuh serangga hingga 100% pada 6 jam setelah perlakuan dengan konsentrasi 0,8 gr, 1 gr, 1,3 gr dan memiliki cara kerja yang paling cepat dibandingkan dengan jenis pestisida Betacyflutrin, Imidacloprid. Sedangkan untuk Dosis  $LC_{50}$  pestisida berbahan aktif metomil yang diujicobakan pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) ditetapkan berada pada konsentrasi 1.89 ppm (Bakoulia *et al* 2008; Purnamasari, 2015).

Bahaya pestisida ini tidak hanya akan dialami oleh organisme target namun juga organisme non target. Masuknya sisa-sisa pestisida ke dalam perairan irigasi persawahan akan mencemari lingkungan (El-Gawad, 2012). Ekosistem perairan adalah salah satu ekosistem yang paling sering terpapar oleh bahan pencemar pestisida (Hachfi *et al.*, 2012). Akibatnya, pestisida yang mencemari perairan tersebut akan membahayakan ikan yang merupakan salah satu organisme utama perairan (Kime, 1999).

Bahaya yang ditimbulkan akibat adanya paparan pestisida metomil terhadap ikan telah dilakukan oleh Li *et al.*, (2008) dimana paparan pada konsentrasi tertentu dari pestisida metomil dapat menyebabkan keracunan yang bersifat akut hingga kematian pada spesies ikan *P. parva*; Namun sebelum ikan menunjukkan gejala stress atau keracunan, adanya paparan pestisida di lingkungan hidupnya akan memicu berbagai perubahan terhadap profil hematologi ikan seperti pada jumlah sel darah putih (WBcs) dan sel darah merah (RBcs). Pengaruh pestisida

juga berdampak pada penurunan kadar hematokrit dan persentase hemoglobin (HB%) secara signifikan (Elbialy et al 2015; Osman et al., 2010; Ibrahim et al., 2009)

Adanya paparan bahan kimia seperti pestisida metomil juga menyebabkan munculnya mikronuklei. Mikronuklei adalah inti sel kedua yang ukurannya lebih kecil daripada inti sel utama. Mikronuklei ini terbentuk akibat adanya kerusakan dan ketidakstabilan kromosom atau kesalahan dalam proses mitosis sel. Saat proses pembelahan sel berlangsung, paparan pestisida akan membuat kromosom atau fragmen dari sebuah kromosom tidak tergabung dalam inti sel anak. Kemunculan mikronuklei dapat dijadikan sebagai bioindikator adanya aktifitas genotoksik dalam tubuh ikan (Sailaja et al, 2006; Tatiana dan Carmem, 2006; Bhatia dan Kumar, 2012). Selain itu, kemunculan mikronuklei ini bahkan dapat menjadi indikator adanya tingkat penyimpangan seluler dan bahaya-bahaya genetik lainnya akibat adanya pemaparan pestisida (Augusto et al., 1997).

Pengaruh langsung paparan pestisida di perairan juga dapat merusak jaringan tubuh ikan (Yosmaniar, 2009). Kerusakan yang muncul salah satunya terjadi pada jaringan insang ikan yang dapat didiagnosa melalui gambaran histologi (Hasheesh dan Ragaa, 2011). Pada lamela insang ikan nila yang terapar pestisida dari jenis karbamat ini, akan mengalami hipertrofi pada sel epithelial, hiperplasia, fusi pada lamella, nekrosis pada epitel insang, eosinofilik eksudat, penyusutan inti sel (*pycnotic nucleus*), meningkatkan adanya pulpa putih dan menurunkan adanya pulpa merah (Altinok dan Erol 2007; Ibrahim et al., 2009).

Pemanfaatan bahan-bahan alami seperti rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) telah secara luas dilakukan sebagai salah satu upaya pengobatan untuk menanggulangi berbagai dampak negatif yang terjadi akibat paparan pestisida terhadap ikan (Luo et al., 2016; Marimutu et al., 2012). Rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) mengandung sejumlah besar flavonoid dan senyawa aktif lainnya. Flavonoid merupakan kelompok terbesar dari golongan fenolik yang



diketahui mengandung spektrum kimia luas dan memiliki aktifitas antioksidan. Ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) juga diketahui memiliki aktifitas antigenotoksik dan antimutagenik karena mampu menghambat terjadinya sejumlah abrasi kromosom, dan melindungi aktifitas mitotik sel. Selain itu, juga mampu menghambat fragmentasi DNA. (Hellio *et al.*, 2001; Gamal-Eldeen *et al.*, 2013; Mehdinezhad *et al.*, 2016).

Kandungan bahan aktif dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) ini juga mampu memperbaiki status kesehatan ikan. Pemberian rumput laut coklat terbukti mampu meningkatkan respon imun nonspesifik yang dapat dilihat dari parameter darah ikan seperti hematokrit, hemoglobin, total sel darah merah dan sel darah putih (Shahi dan Singh 2011; Kanimozhi *et al* 2013).

## 1.2 Rumusan Masalah

Masuknya bahan pencemar yang salah satunya pestisida berbahan aktif metomil kedalam perairan dapat mencemari ekosistem perairan dan akan berdampak negatif terhadap status kesehatan ikan sebagai organisme perairan. Rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktifitas biologi yang luas dan mampu membantu meningkatkan kekebalan tubuh dan status kesehatan ikan terhadap bahan pencemaran pestisida. Berdasarkan hal tersebut, dapat dirumuskan permasalahan pada penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana dampak paparan pestisida berbahan aktif metomil terhadap status kesehatan ikan nila (*Oreochromis niloticus*)?
2. Bagaimana pengaruh bahan aktif (flavonoid) dari rumput laut coklat (*sargassum* sp.) terhadap status kesehatan ikan nila yang telah dipapar pestisida berbahan aktif metomil?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mendapatkan konsentrasi letal pestisida berbahan aktif metomil dan pengaruhnya terhadap status hematologi, mikronuklei dan histologi insang ikan nila (*Oreochromis niloticus*)
2. Untuk mendapatkan isolat dan konsentrasi flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) terbaik dilihat dari parameter hematologi, mikronuklei dan histologi ikan (*Oreochromis niloticus*) yang telah terpapar konsentrasi letal pestisida berbahan aktif metomil.

### 1.4 Manfaat penelitian

Informasi tentang toksisitas pestisida berbahan aktif metomil terhadap organisme perairan khususnya ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dalam penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan dalam penggunaan pestisida berbahan aktif metomil; serta informasi tentang potensi flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dalam meningkatkan status kesehatan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan hematologi, mikronuklei dan histologi insang, dapat menjadikan rumput laut coklat sebagai alternatif pengobatan.

### 1.5 Penelitian Terdahulu

Terdapat beberapa penelitian terdahulu yang berkaitan dengan dampak pestisida dan manfaat flavonoid seperti yang disajikan pada tabel 1.

**Tabel 1. Penelitian Terdahulu**

No.	Judul	Tahun	Peneliti
1	Genotoxic Potential of Pesticides in the Peripheral Blood Erythrocytes of Fish ( <i>Oreochromis mossambicus</i> ).	2016	Gul-e-Zehra Naqvi Nafisa Shoaib Aisha Majid Ali
2	Effect of Flavonoids in Acetaminophen Induced Liver Injury in <i>Danio Rerio</i> .	2016	Jyotsna Swarnalatha Y.

3	Histopathology of Rainbow Trout Exposed to Sublethal Concentrations of Methiocarb or Endosulfan.	2007	Ilhan Altinok Erol Capkin
4	Total Flavanoid and in vitro Antioxidant Activity of Two Seaweeds of Rameshwaram Coast.	2009	S. Meenakshi D. M. Gnanambigai S. Tamil mozhi M. Arumugam T. Balasubramanian
5	Effects of methomyl on steroidogenic gene transcription of the hypothalamic-pituitary-gonad-liver axis in male tilapia	2016	Shun Long Meng Li Ping Qiu Geng Dong Hu Li Min Fan Chao Song Yao Zheng Wei Wu Jian Hong Qu Dan Dan Li Jia Zhang Chen Pao Xu
6	Effects of chronic exposure of methomyl on the antioxidant system in liver of Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	2016	Shun Long Meng Jia Zhang Chen Geng Dong Hu Chao Song Li Min Fan Li Ping Qiu Pao Xu
7	Anti-genotoxic effect of the <i>Sargassum dentifolium</i> extracts: Prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation	2016	Amira M. Gamal-Eldeena Mona A.M. Abo-Zeidb Eman F. Ahmedc
8	Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Dari Daun Tumbuhan Sirih Merah ( <i>Piper Crocatum</i> Ruiz & Pav)	2010	Daniel
9	Acute Toxicity Evaluation Of An Insecticide Used In Potato Cultures With The Use Of Bioassays	2008	Panagoula Bakoulia Constantina Karadima Angela Rouvalis Joan Iliopoulou-Georgudaki
10	Assessment of Genotoxic Effects of Pesticide Residues and Related Haemato-Biochemical Parameters on Farmed Nile Tilapia ( <i>Oreochromis Niloticus</i> L.) in Kafrelsheikh Governorate, Egypt	2015	Elbialy Z I Ismail T Abdelhady H D El-Asely M A.



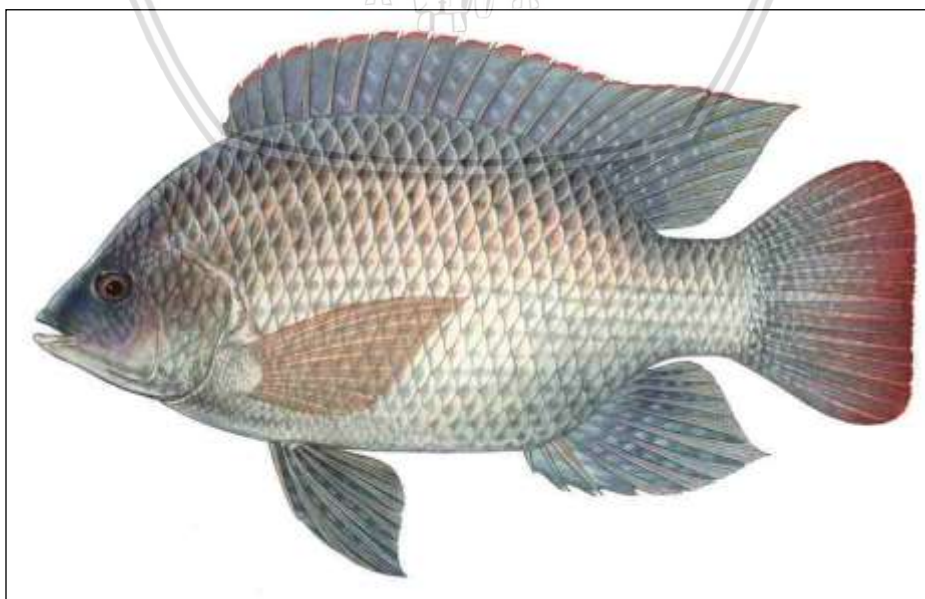
## 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Gambaran ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dapat dilihat pada gambar 1. Berdasarkan taksonominya, ikan nila dapat diklasifikasikan sebagai berikut menurut Saanin (1984):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Osteichtyes
Subkelas	: Acanthopterygii
Ordo	: Percomorphi
Subordo	: Percoidea
Famili	: Cichlidae
Genus	: <i>Oreochromis</i>
Spesies	: <i>Oreochromis niloticus</i>



Gambar 1. Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) (Gardenware, 2016)

Berdasarkan morfologinya, Bentuk badan ikan nila pipih ke samping memanjang. warna tubuh pada umumnya putih kehitaman dan merah sehingga dikenal sebagai “nila hitam” dan “Nila Merah”. Tubuh ikan nila hitam berwarna kehitaman, makin ke perut makin terang. Mempunyai garis vertical 9-11 buah berwarna hijau kebiruan. Pada sirip ekor terdapat 6-12 garis melintang yang ujungnya berwarna kemerahan, sedangkan punggungnya terdapat garis miring. Mata ikan nila tampak menonjol agak besar dengan bagian tepi berwarna hijau kebiruan. Letak mulutnya terminal, posisi sirip perut terhadap sirip dada *thorocis*, dan garis rusuk (*linea lateralis*) yang terputus menjadi dua bagian. Letaknya memanjang di atas sirip dada. Jumlah sisik pada garis rusuk 34 buah dan tipe sisik *ctenoid*. Jari jari siripnya terdiri dari 17 jari-jari keras dan 13 jari-jari lunak pada sirip punggung. 1 jari-jari keras dan 5 jari-jari lunak pada sirip perut, 15 jari-jari lunak pada sirip dada, 3 jari-jari keras, 10 jari-jari lunak pada sirip dubur (anus), dan sirip ekor terdapat 8 jari-jari keras melunak (Ghufron dan Kordi, 2010).

### 2.1.2 Habitat

Ikan nila adalah salah satu ikan perairan tawar yang umum dikonsumsi. Ikan nila hidup pada berbagai habitat di air tawar seperti saluran air yang dangkal, kolam, sungai dan danau. Karena sifat ikan nila yang *euryhaline* atau memiliki tingkat toleransi salinitas yang luas, tidak jarang kalau ikan ini juga dapat ditemukan hidup di perairan payau. Pada perairan yang bersuhu hangat, Ikan nila dapat tumbuh optimal bahkan dapat menjadi spesies invasif. Sebaliknya, ikan nila tidak mampu bertahan hidup pada perairan di daerah yang beriklim dingin yang pada umumnya memiliki suhu di bawah 21°C (Harrysu, 2012).

Ikan nila dapat hidup pada habitat yang memiliki kisaran suhu antara 14°C-38 °C dan dapat memijah secara alami pada suhu 22 °C sampai 37 °C. Sedangkan kisaran suhu untuk pertumbuhan dan perkembangan ikan nila berkisar

antara 25 °C sampai 30 °C. Selain suhu, faktor lain dalam habitat yang mempengaruhi hidup ikan nila adalah salinitas. Kisaran salinitas untuk ikan nila adalah antara 0 ‰ sampai 29 ‰. Namun pada salinitas 29 ‰ sampai 39 ‰ ikan nila masih mampu bertahan hidup akan tetapi tidak dapat melakukan reproduksi. (Khairuman dan Amri, 2012).

### 2.1.3 Keunggulan ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah salah satu ikan yang paling banyak dibudidayakan di perairan darat. Selain karakteristiknya petumbuhannya yang cepat dan cocok di berbagai lingkungan, ikan nila juga memiliki pasar yang luas dengan harga pasar yang relatif stabil (Wing-Keong and Nicholas, 2013).

Kelebihan dari ikan nila yang lain menurut Wade et.al (2012) untuk budidaya perikanan adalah kebutuhan terhadap pakan komersil yang rendah. ikan ini dapat tumbuh cepat walaupun diberi makan dengan pakan yang rendah protein dan tinggi karbohidrat karena anggota dari genus *Oreochromis* merupakan jenis omnivora yang dapat memakan alga, tanaman air, invertebrata kecil, detritus dan biofilm yang dihasilkan asosiasi bakteri yang sekaligus dapat membuat para pembudidaya tidak harus mengeluarkan biaya yang mahal untuk pakan walaupun dibudidayakan pada kondisi ekstensif atau semiintensif tergantung produktifitas alami lingkungan budidaya. selain itu, ikan Nila juga dapat dibudidayakan dengan kepadatan yang tinggi dan relatif tahan terhadap penyakit pada kondisi tersebut.

## 2.2 Pestisida

### 2.2.1 Pengetian Pestisida

Pestisida secara umum menurut Meidiantie et. al, (2010) merupakan bahan beracun yang sangat berbahaya baik bagi kesehatan maupun lingkungan. Hal ini disebabkan karena pestisida memiliki sifat polutan dan mampu menyebarkan radikal bebas. Radikal bebas yang timbul akibat paparan pestisida dapat

menyebabkan berbagai kerusakan pada organ-organ tubuh seperti mutasi genetik dan gangguan susunan saraf pusat.

Pestisida memiliki peran yang sangat penting dalam produksi pangan dengan mengontrol serangga, gulma, penyakit tanaman dan berbagai hama lainnya. Kebanyakan pestisida memiliki dampak dan resiko yang tinggi terhadap manusia, hewan dan lingkungan karena pada dasarnya pestisida memang di desain untuk membunuh organisme atau memberikan dampak lain sesuai yang dituliskan pada labelnya. Akan tetapi lebih dispesifikkan kepada organisme atau spesies yang ditargetkan (David 2004).

Berdasarkan sasaran yang akan dikendalikan, Djojsumarto (2008) mengklasifikasikan pestisida karbamat kedalam golongan Akarisida atau sering disebut mitisida yaitu bahan yang mengandung senyawa kimia beracun yang digunakan untuk membunuh tungau, capika, dan laba-laba. Beberapa bahan aktif pada akarisida yaitu abamektin, dikofol, dimetoat, etion, metamidofos, mevinfos, monokrotofos, forat, fosfamidon, piridafention, triazofos, metomil.

### **2.2.2 Perjalanan Pestisida ke Perairan**

Di dunia pertanian, penggunaan pestisida banyak dilakukan dengan metode penyemprotan. Dalam metode ini, larutan pestisida akan dipecah oleh nozzle (cera atau spuyer) mejadi butiran butiran kecil yang kemudian didistribusikan ke sasaran penyemprotan (Djojsumarto, 2008).

Saat dilakukan penyemprotan mengemukakan adanya kemungkinan yang pertama adalah terdistribusinya butiran-butiran pestisida oleh hembusan angin menuju media non target yang sebenarnya tidak diinginkan. Kemungkinan yang lain menurut wudianto (2010) adalah sebagian dari butiran-butiran pestisida yang membasahi media target menetes ke tanah yang diakibatkan karena penyeprotan terlalu lama pada media target atau butiran-butiran pestisida yang disemprotkan



terlalu besar. Tetesan tersebut kemudian diserap oleh partikel-partikel tanah yang menyebabkan terakumulasinya pestisida di dalam tanah dan menimbulkan adanya pencemaran tanah. Ketika terjadi hujan, partikel partikel yang terakumulasi dalam tanah maupun sisa-sisa pestisida pada target akan terbilas dan terbawa ke aliran-aliran air irigasi hingga menuju sungai sehingga menyebabkan pencemaran sungai oleh pestisida. Robinson (1973) mengemukakan bahwa aliran pembuangan pestisida beragam menurut laju arus air permukaan dan jenis tanah, sedangkan pencucian mula-mula bergantung pada adsorpsi/desorpsi antara konstituen tanah dan pergolakan air yang melaluinya.

## **2.3 Pestisida Metomil**

### **2.3.1 Pengertian Pestisida Metomil**

Pestisida berbahan aktif metomil biasa digunakan oleh petani sebagai insektisida. Ini karena pestisida yang berbahan aktif metomil ternyata mempunyai nilai toksisitas yang tinggi dan cara kerja yang paling cepat apabila dibandingkan dengan insektisida yang lainnya dan mampu membunuh 100% target dalam waktu 6 jam. Berbeda dengan insektisida berbahan aktif Betacyflutrin, Imidacloprid dan Thiametoxam yang merupakan kelompok insektisida Kloronikotini dan Peritroik Sintetik (SP) yang memiliki daya toksisitas yang rendah (Purnamasari, 2015).

Pestisida Metomil (S-methyl-1-N-[(methylcarbamoyl)oxy]thioacetimidate) adalah pestisida dari golongan karbamat. Sekitar 15% kasus keracunan akibat bahan kimia pertanian di Jepang dari tahun 2009 hingga 2013 diakibatkan oleh adanya masukan bahan pestisida berbahan aktif metomil. Ikan nila yang dipapar pestisida metomil dalam konsentrasi subletal selama 30 hari dapat mempengaruhi kinerja system antioksidan pada hati dan meningkatkan keberadaan oksidatif stress. (National Research Institute of Police Science, 2015; meng *et al*, 2013).

Insektisida Lannate® 25 WP hadir sejak tahun 1978, efektif dan cepat mengendalikan hama penggerek buah tomat *Heliothis* sp. Dengan racun kontak dan perut serta knock down effect-nya dapat mengendalikan serangga dalam waktu 15 menit. Dengan dosis rekomendasi 1.5 - 3.0 g/L yang diaplikasikan 5 kali per musim tanam, dapatkan produktivitas dan kualitas terbaik tanaman (dupont.co.id, 2017).

### 2.3.2 Sifat Pestisida Metomil

Metomil merupakan pestisida dari golongan insektisida. Menurut SNI 02-7174-2006. Metomil teknis merupakan padatan berbentuk tepung berwarna putih hingga krem, dengan nama kimia S-methyl N-(methyl carbamoyloxy) thioacetimidate, rumus molekul  $C_5H_{10}N_2O_2S$ , nomor CAS 16752-77-5 dan digunakan sebagai bahan aktif insektisida dan akarisida. Pestisida ini relatif mudah diurai di lingkungan (tidak persisten), akan tetapi insektisida ini bersifat reversibel yaitu menghambat kerja enzim kolinesterase (ChE) secara langsung, melalui karbomoylasi dari gugusan ester enzim tersebut (Djojsumarto, 2008).

Metomil adalah insektisida dengan spektrum N-methyl carbamate yang luas dengan aktivitas sebagai anti-cholinesterase yang banyak digunakan sebagai insektisida baik untuk tanaman buah dan sayuran, lahan gambut, tempat tinggal ternak, tempat komersial dan tempat sampah (miglena, 2015). Metomil bersifat stabil saat berada dalam keadaan padat dan dengan larutan sedikit asam atau netral (Van Scoy et al., 2013). Metomil dalam bentuk larutan cair telah dilaporkan mudah terdegradasi melalui aerasi, paparan sinar matahari atau dalam media alkalin (Howard, 1991).

### 2.3.3 Dampak Pestisida Metomil Pada Ikan

Paparan pestisida cenderung akan berdampak pada kesehatan suatu organisme. Beberapa studi yang telah dilakukan mengevaluasi adanya potensi

terjadinya genotosisitas akibat paparan pestisida. (Sailaja *et. al*, 2006). Selain berdampak genotoksik, paparan pestisida dapat menimbulkan radikal bebas (*free radical*) pada tubuh ikan. Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa yang mempunyai elektron tidak berpasangan (Winarsi, 2007). Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan. Molekul radikal bebas ini akan secara aktif merebut elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya untuk menstabilkan diri. Adanya radikal bebas dalam tubuh organisme erat kaitannya dengan kerusakan sel, kerusakan jaringan, dan lain lain (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Kelarutan suatu bahan aktif pestisida di dalam air merupakan faktor penting yang akan menentukan persistensinya di lingkungan perairan. Secara histologi jaringan, pengaruh langsung paparan pestisida di perairan dapat memberi dampak pada jaringan tubuh ikan, sedangkan pengaruh tidak langsung dapat terjadi dengan berkurangnya organisme pakan alami ikan sehingga menghambat pertumbuhan ikan (Yosmaniar, 2009).

Pada konsentrasi tertentu, pestisida metomil dapat menyebabkan keracunan akut pada spesies *P. parva*, menyebabkan kematian, neurotoksik dan menyebabkan beberapa perubahan pada sejumlah enzim hepatic. Sedangkan pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan gangguan pada system endokrin dan menyebabkan gangguan berbagai gen tertentu pada testis dan kelenjar pituitary pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang mengarah pada perubahan tingkat hormon seks steroid dan vitellohenin. Hal ini pada akhirnya akan menyebabkan system reproduksi ikan nila mengalami disfungsi. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang mengalami paparan melalui perairan yang terkontaminasi metomil menimbulkan potensi dampak negatif yaitu terjadinya gangguan pada sistem antioksidan pada hati ikan. dampak tersebut semakin meningkat seiring

meningkatkan waktu dan konsentrasi pemaparan (li *et.al*, 2008; ShunLong *et. al.*, 2016; Meng *et. al.*, 2014).

Studi tentang dampak pemaparan pestisida menerangkan adanya sejumlah peningkatan pada jumlah sel mikronuklei pada perifer sel darah merah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) setelah terpapar oleh pestisida. Sel mikronuklei pada sel darah merah (eritrosit) ikan dapat dijadikan sebagai teknik bioassay yang sangat berguna dalam pengujian adanya dampak genotoksisitas. Hal ini juga menunjukkan bahwa analisis mikronuklei memiliki potensi sebagai alat untuk melihat kualitas air secara *in situ* (Naqvi *et. al.*, 2016; Al-Sabti dan Metcalfe, 1995).

## 2.4 Genotoksik

### 2.4.1 Pengertian Genotoksik

Genotoksik merupakan efek kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang dipengaruhi oleh agen kimia maupun fisika yang mampu memodifikasi basa nukelotida maupun *sugar-phosphate backbone* dari DNA (Kastan *et al.*, 2004). Kerusakan pada DNA tersebut diantaranya dapat diakibatkan oleh terjadinya ikatan kovalen suatu agen toksik pada DNA. Jenis kerusakan DNA dapat berdampak pada kematian atau mutagenisitas sel, yang dapat menjurus pada kanker. Terdapat enam jenis kerusakan DNA, yaitu depurinasi basa, oksidasi basa, deaminasi basa, metilasi basa, DNA-DNA *crosslink*, dan DNA-protein *crosslink* (Swift *et al.*, 2014).

Genotoksis didefinisikan sebagai sifat senyawa yang dapat menyebabkan ketidakstabilan genetic hingga kerusakan pada DNA sehingga dapat merubah sistem biologis dan fungsional tubuh. Senyawa genotoksis ini menyebabkan perubahan biosintesis protein dan metabolisme DNA, perubahan struktur kromosom, kesalahan perbaikan DNA atau selama replikasi DNA, sehingga mengarah pada berbagai penyakit, termasuk kanker (Siswandono *et al.*, 2000).



### 2.4.2 Mekanisme Pestisida dalam Tubuh Ikan

Pestisida masuk ke dalam tubuh manusia melalui difusi-osmosis, oral, dan melalui inhalasi (pernafasan). Di dalam darah ikan, pestisida ini akan berikatan dengan enzim cholinesterase yang berfungsi untuk mengatur kerja syaraf. Dan karena adanya pestisida dalam darah maka Acetilcholinesterase (AchE) akan diikat oleh pestisida, sehingga kinerja enzim tidak berjalan dengan maksimal dalam tubuh terutama dalam mengirim perintah kepada otot-otot. Akibatnya otot-otot bergerak tanpa dapat dikendalikan (Sudarno, 1997).

Dalam tubuh ikan, diproduksi asetikolin dan enzim kholinesterase. Enzim ini berfungsi memecah asetilkolin menjadi kolin dan asam asetat. Asetilkolin dikeluarkan oleh ujung-ujung syaraf ke ujung syaraf berikutnya, kemudian diolah dalam *Central Nervous System* (CNS), akhirnya terjadi gerakan tertentu yang dikoordinasikan oleh otak. Apabila paparan pestisida terjadi secara berulang pada jangka waktu yang lama, maka mekanisme kerja enzim kholinesterase terganggu, dengan akibat adanya gangguan pada system syaraf berupa aktifitas kolinergik secara terus menerus akibat asetilkolin yang tidak dihidrolisis. Hal ini dikenal sebagai tanda-tanda atau gejala keracunan (Syarief, 2007).

Asetikholin memiliki peran sebagai jembatan penyeberangan bagi mengalirnya getaran syaraf. Melalui sistem syaraf inilah organ-organ di dalam tubuh menerima informasi untuk memperingatkan atau mengurangi efektifitas sel. Pada sistem syaraf, rangsangan yang diterima dijalarkan melalui serabut-serabut syaraf (akson) dalam bentuk impuls. Setelah impuls syaraf oleh asetikholin dipindahkan (diseberangkan) melalui serabut, enzim kholinesterase memecahkan asetikholin dengan cara meghidrolisis asetikholin menjadi kolin dan sebuah ion asetat, impuls syaraf kemudian berhenti. Reaksi-reaksi kimia ini terjadi sangat cepat (Dirjen PPM & PLP, 2001).

Hadirnya pestisida golongan organofosfat di dalam tubuh akan menghambat aktifitas enzim asetilkholinesterase, sehingga terjadi akumulasi substrat (asetilkholin) pada sel efektor. Keadaan tersebut diatas akan menyebabkan gangguan sistem syaraf yang berupa aktifitas kolinergik secara terus menerus akibat asetilkholin yang tidak dihidrolisis. Gangguan ini selanjutnya akan dikenal sebagai tanda-tanda atau gejala keracunan (Syarief, 2007).

#### 2.4.3 Mekanisme dan Dampak terjadinya genotoksik

Secara garis besar mekanisme kerusakan DNA oleh senyawa genotoksik dibagi menjadi efek kerusakan langsung dan tidak langsung. Pada efek kerusakan langsung, senyawa genotoksik biasanya bersifat elektrofilik dimana senyawa tersebut dapat terikat langsung dengan senyawa nukleofilik seperti DNA dan dapat mengakibatkan terjadinya pemutusan pada rantai DNA, berubahnya basa DNA, *intercalation*, atau *cross linkage* (John, 1990)

Efek genotoksik tersebut disebabkan oleh aktivasi siklofosamid menjadi 4-hidroksisiklofosamid yang dikatalisis oleh CYP2B6; 2C9; 3A4 yang merupakan *isozyme* dari enzim oksidase *hepatic cythochrome* P450 (CYP450). CYP3A4 merupakan bentuk utama dari CYP450 dengan persentase jumlah yang cukup banyak (25% dari seluruh famili CYP450 dan sangat penting dalam oksidasi obat (Guengrich, 1995; Shimada *et al.*, 1994). Senyawa 4-hidroksisiklofosamid tersebut selanjutnya akan mengalami interkonversi secara cepat menjadi tautomernya, aldofosamid. Aldofosamid akan mengalami reaksi eliminasi secara spontan (non-enzimatik) untuk menghasilkan *phosphoramid mustard* (PM). PM inilah yang secara umum diketahui sebagai DNA *crosslinking agent* (Shukla *et al.*, 2001) yang dapat mengakibatkan terbentuknya mikronukleus dan kematian sel (Bryce *et al.*, 2010; Tripathi and Jena, 2009).

## 2.5 Sistem Imun Pada Ikan

Ikan adalah organisme pertama yang diketahui memiliki system imun innate dan adaptif sehingga studi yang mempelajari hewan ini memiliki tingkat relevansi yang tinggi dalam menyajikan informasi tentang evolusi system imun pada vertebrata (Litman *et. al*, 2005). Sistem imun innate sangat penting bagi ikan (Magnadóttir, 2006; Gao *et. al*, 2015). Komponen utama dari imunitas humoral pada ikan antara lain adalah peptida antibakteri, lisozim, lektin, protein fase akut, dan molekul dari sistem komplemen, sedangkan sel imun innate adalah makrofag, neutrofil, dan eosinofil (Saurabh *et. al*, 2008; Alvarez, 2008).

Disamping itu, mekanisme imunitas adaptif pada ikan memiliki peran yang vital dalam proteksi terhadap infeksi berulang dimana respon ini dimediasi oleh sel T dan sel B-lymphocytes serta antibody. Ikan adalah vertebrata pertama dimana seleksi klonal dan mampu melakukan penataan ulang genetik pada reseptor limfosit. Demikian juga, leukosit dengan aktivitas sel T pada leukosit telah banyak dipelajari, serupa dengan sel T yang bersifat kooperatif dan sitotoksik pada mamalia (CD4<sup>+</sup>-like, CD8<sup>+</sup>-like). Selain itu, berdasarkan profil sitokin, ada sebuah studi yang menjelaskan tentang adanya subpopulasi sel T yang mirip dengan yang ada pada mamalia. Sebaliknya, sel B pada ikan telah ditandai melalui ekspresi reseptor antigen (BCR). Pada ikan, IgM adalah sebuah antibodi terlarut yang utama, yaitu tetramer dan di sisi lain, IgD, sama seperti pada mamalia, diekspresikan di permukaan sel B. Selain itu, isotipe lain yang telah teridentifikasi, seperti IgT dan IgZ, pada umumnya ditemukan pada lapisan mukosa, seperti di usus, di kulit, dan pada insang (Laing dan Hansen, 2011; Sunyer 2013)

## 2.6 Sistem Imun Ikan Terhadap Paparan Pestisida

Pada ikan, molekul yang bertanggung jawab atas respons humoral bawaan dan adaptif dapat diubah oleh berbagai zat yang salah satunya adalah pestisida

(Díaz-Resendiz, 2015). Molekul tersebut adalah molekul lisozim yang memiliki peran penting dalam system imun innate yang sering mengalami perubahan akibat paparan pestisida. Sebuah studi menunjukkan bahwa aktifitas lisozim meningkat pada hati dan limpa ikan sturgeon (*Huso huso*) yang terekspose pestisida diazinon dengan konsentrasi akut (1,5 ppm) namun pada paparan dengan konsentrasi subakut dan subklinis, aktivitas lisozim menurun pada plasma, hati, ginjal, dan limpa (Khoshbavar-Rostami et. al, 2006).

Pada penelitian terbaru, dilaporkan bahwa paparan klorpirifos (0,102 dan 0,2555 ppm) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dapat memicu peningkatan aktivitas lisozim dalam plasma akan tetapi pada konsentrasi yang lebih rendah (0,051 ppm), pestisida ini tidak menyebabkan efek pada aktivitas enzim tersebut (Díaz-Resendiz, 2014).

Molekul penting lainnya dari sistem imun innate pada ikan adalah protein C3 komplemen yang juga dapat mengalami perubahan akibat paparan pestisida. Deregulasi pada konsentrasi dan ekspresi mRNA molekul ini telah dilaporkan terjadi pada ginjal anterior, limpa, dan plasma ikan mas (*C. carpio* L.) yang terpapar pestisida klorofenrifos secara akut (Li et. al, 2013).

Reactive C protein (RCP) adalah molekul lain yang memiliki peran terhadap system imun innate ikan yang terkena paparan pestisida. Dalam konteks ini, telah dilaporkan bahwa paparan akut terhadap pestisida metrifonat (0,4 ppm) pada ikan rainbow trout (*O. mykiss*) selama 3 hari dapat memicu terjadinya peningkatan protein RCP secara signifikan dalam plasma dan pada 10 dan 18 hari setelah terpapar, aktivitas protein berkurang secara signifikan (Kodama, 2004)

## **2.7 Rumput Laut Coklat *Sargassum* sp.**

*Sargassum* adalah sebutan dari sekelompok alga cokelat (Phaeophyta) dalam genus dengan nama yang sama. Genus ini memiliki banyak spesies dan



hidup di perairan tropis dan sub-tropis di seluruh dunia. Alga dari genus ini memiliki berbagai macam cara hidup, kebanyakan alga dari genus ini ditemukan hidup menetap dan menempel pada substrat, sementara beberapa jenis lain ditemukan hidup melayang hingga menuju laut lepas.

### 2.7.1 Klasifikasi dan Morfologi *Sargassum* sp.

Ciri-ciri khusus yang dimiliki *Sargassum* sp. antara lain adalah thallus berbentuk pipih, licin, batang utama berbentuk bulat agak kasar, dan memiliki holdfast berbentuk cakram yaitu bagian yang digunakan untuk melekat. Cabang pertama *Sargassum* sp. timbul pada bagian pangkal, terletak sekitar 1 cm dari holdfast. Sistem percabangannya secara teratur berselang seling. Bentuk daun oval dan memanjang berukuran (40x10) mm dengan pinggir daun memiliki gerigi yang jarang-jarang, bergelombang, dan ujungnya melengkung atau meruncing. Pada batang *Sargassum* sp. Memiliki vesicle yaitu gelembung yang menyerupai buah dan berbentuk lonjong agak pipih, ujung meruncing berukuran (7x1,5) mm. *Vesicle* berbentuk lonjong, ujung meruncing berukuran (7x1,5) mm, dan agak pipih. Cabangnya rimbun menyerupai pohon di darat. Bentuk daun melebar, lonjong atau seperti pedang. Mempunyai gelembung udara (bladder) yang umumnya soliter. Warna thallus umumnya coklat (Othmer, 1986)

Menurut Guiry dan Guiry (2017), taksonomi *Sargassum* sp secara umum adalah sebagai berikut dan bentuknya dapat dilihat pada gambar 1 :

Kerajaan	: Chromalvoelata
Divisi	: Heterokontophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Bangsa	: Fucales
Suku	: Sargassaceae
Marga	: <i>Sargassum</i>
Jenis	: <i>Sargassum</i> sp.



**Gambar 2. Sargassum Sp. (Guiry dan Guiry, 2016)**

### **2.7.2 Habitat *Sargassum* sp.**

*Sargassum* sp. menurut Othmer, (1986) merupakan salah satu jenis rumput laut yang dapat tumbuh pada substrat berupa batu karang yang berada di daerah pantai yang berombak. Kadi (2005) menambahkan, *Sargassum* sp. Juga dapat tumbuh secara subur pada daerah beriklim tropis dengan suhu perairan berkisar antara 27,25°C hingga 29,3 °C dan memiliki salinitas yang berkisar antara 32 hingga 33,5 promil. Kebutuhan intensitas cahaya matahari lebih tinggi karena kandungan klorofil pada *Sargassum* sp lebih banyak dan klorofil tersebut berperan dalam fotosintesis.

### **2.7.3 Kandungan Bioaktif *Sargassum* Sp.**

Kandungan bioaktif dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dewasa ini telah banyak dipelajari pada berbagai penelitian. Ekstrak metanol dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) diketahui menunjukkan aktifitas antioksidan yang tergolong dalam kategori kuat (Patra, 2008). Extrak yang berasal dari berbagai jenis rumput laut sargassum seperti dari jenis *Sargassum integerrimum*, *Sargassum maclurei*, *Sargassum naozhouense*, dan *Spiraea thunbergii* menunjukkan bahwa kandungan bioaktifnya di dalamnya memiliki aktifitas neuroprotektif dan aktifitas antioksidan (Jin, 2014).

Analisis fitokimia yang telah dilakukan terhadap ekstrak dari beberapa rumput laut coklat seperti *Sargassum angustifolium*, *Sargassum oligocystum* dan *Sargassum boveanum* juga menunjukkan bahwa rumput laut coklat ini mengandung sejumlah besar senyawa metabolit sekunder yang diantaranya seperti tannin, saponin, sterol dan triterpen, flavonoid, kardiak glikolisis dan antaraquinon (Mehdinezhad *et. al*, 2016). Ekstrak dari rumput laut coklat juga diketahui mempunyai dampak aktifitas biologis sebagai antigenotoksik. tretmen dengan ekstrak rumput laut coklat dapat secara dramatis mengurangi abrasi kromosom (Gamal-Eldeen *et. al.*, 2013).

## **2.8 Flavonoid**

### **2.8.1 Pengertian Flavonoid**

Flavonoid adalah senyawa golongan metabolit sekunder yang disintesis dari asam piruvat melalui metabolisme asam amino (Bhat *et al.*, 2009). Pada umumnya senyawa flavonoid ini banyak terdapat di seluruh bagian tanaman yang mana flavonoid ini sangat efektif digunakan sebagai antioksidan (Astawan dan Kasih 2008). Senyawa flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid (Harborne 1987).

Flavonoid merupakan golongan dari pigmen organik yang tidak mengandung molekul nitrogen. Penamaan dari flavonoid berasal dari bahasa latin yang mengacu pada warna kuning saat diuji dengan menggunakan metode fitokimia dan sebagian besar flavonoid adalah berwarna kuning. Senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam tanaman sering kali ditemukan dalam bentuk pigmen dan co-pigmen. Kombinasi dari berbagai macam pigmen ini membentuk pigmentasi pada tanaman. Selain itu juga mempunyai manfaat yang penting sebagai antioksidan (Bhat *et al.*, 2009).

Terdapat flavonoid dalam jumlah tinggi dalam ekstrak metanol *Sargassum siliquosum* yang menunjukkan adanya aktifitas antioksidan yang tinggi pada tanaman *Sargassum* sp. Bioaktif dari golongan flavonoid sendiri mempunyai suatu aktifitas fisiologikal dan farmatikal yang berbeda jika dibandingkan dengan golongan bioaktif yang lain yaitu pada aktifitasnya biologinya yang berfungsi sebagai antioksidan, anti-karsinogen, anti-inflamatori dan mampu meningkatkan fungsi endotelial (Han *et. al*, 2007; Corpuz *et. al*, 2012)

Flavonoid merupakan senyawa turunan fenol. Terdapat sekitar 10 jenis flavonoid yaitu antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavanil, khalkon, auron, flavanon, dan isoflavone. Warna senyawa golongan flavonoid bisa berubah apabila ditambah larutan yang bersifat basa atau ammonia. Senyawa flavonoid ini mudah dideteksi pada kromatografi atau dalam larutan. Senyawa ini mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi, oleh karena itu flavonoid menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak (Harborne, 1987).

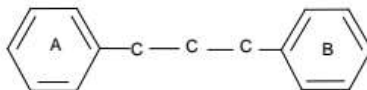
Menurut tingkat kepolarannya, senyawa golongan flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar. Akan tetapi masih terdapat sejumlah senyawa flavonoid dengan tingkat kepolaran yang rendah. Beberapa contoh dari golongan flavonoid yang memiliki tingkat kepolaran rendah antara lain Isoflavon, flavanon, flavon methyl, flavonol (Anderson dan Markam 2006).

### 2.8.2 Struktur Dasar Senyawa Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang mempunyai 15atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu olehrantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon. Senyawa-senyawa flavonoid adalahsenyawa 1,3 diaril propana, senyawa isoflavonoid adalah

senyawa 1,2 diaril propana, sedangkan senyawa-senyawa neoflavonoid adalah 1,1 diaril propane (Doloksaribu, 2011)

Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung C15 terdiri atas dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon. Struktur dasar flavonoid menurut Sastrohamidjojo (1996) dapat digambarkan sebagai gambar 3 :



**Gambar 3. Kerangka dasar senyawa flavonoid**

### 2.8.3 Kelarutan Flavonoid

Aglikon flavonoida adalah polifenol dan karena itu mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Tetapi harus diingat, bila dibiarkan dalam larutan basa, dan disamping itu terdapat oksigen, banyak yang akan terurai. Karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, atau suatu gula, flavonoid merupakan senyawa polar, maka umumnya flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti Etanol (EtOH), Metanol (MeOH), Butanol (BuOH), Aseton, Dimetilsulfoksida (DMSO), Dimetilformamida (DMF), Air dan lain-lain. Adanya gula yang terikat pada flavonoid (bentuk yang umum ditemukan) cenderung dapat menyebabkan flavonoid menjadi lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut yang disebut diatas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida (Doloksaribu, 2009).

Pada umumnya flavonoid sedikit larut dalam pelarut polar misalnya etanol, metanol, butanol, aseton dan sebagainya. Flavonoid juga mudah larut dalam air, karena adanya gula yang terikat. Sedangkan aglikon flavonoid yang kurang polar misalnya isoflavan, flavanon dan flavon serta flavanol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam eter dan kloroform (Markham, 1988).



## 2.9 Ekstraksi dan Pemisahan Senyawa Flavonoid

### 2.9.1 Ekstraksi

Ekstraksi didefinisikan sebagai proses penarikan komponen yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari bahan tersebut. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan harus memperhatikan daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Khopkar 2003).

Proses ekstraksi akan bertambah baik jika permukaan bahan yang bersentuhan langsung dengan pelarut semakin luas maka kecepatan difusi aktif melewati membrane semakin besar sehingga semakin mudah zat aktif melewati membrane sel. Hasil ekstrak yang telah diuapkan semua pelarutnya akan berbentuk kental disebut ekstrak (Husnah, 2009)

Secara umum ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari seluruh bagian tumbuhan seperti daun, batang dan akar umumnya dilakukan secara maserasi menggunakan pelarut organik polar seperti methanol. Juniarti *et. al*, (2009) mengemukakan beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan antara lain :

#### a. Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperature ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membrane sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan

memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Senyawa umum pelarut methanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder.

b. Perkolasi

Merupakan proses melewati pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama-sama pelarut. Tetapi efektivitas dari proses ini hanya akan lebih besar untuk senyawa organik yang sangat mudah larut dalam pelarut yang digunakan.

c. Metode soklet

Menggunakan soklet dengan pemanasan dan pelarut akan dapat dihemat karena terjadinya sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Proses ini sangat baik untuk senyawa yang tidak terpengaruh panas.

d. Destilasi uap

Proses destilasi uap lebih banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan pada suhu yang cukup tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan. Pada umumnya lebih banyak digunakan untuk minyak atsiri.

e. Pengempaan

Metode ini lebih banyak digunakan dalam proses industri seperti pada isolasi *Crude Palm Oil* (CPO) dari buah kelapa sawit dan isolasi katecin dari daun gambel, dimana pada proses ini tidak menggunakan pelarut. Sifat penting yang harus diperhatikan dalam ekstraksi adalah kepolaran senyawa dilihat dari gugus polarnya. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda pada pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik, maka pelarut tersebut semakin polar (Nur dan Adijuwana, 1989). Beberapa pelarut organik dan sifat fisiknya dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Beberapa pelarut organik beserta sifat fisiknya menurut Nur dan Adijuwana, (1989)**

Jenis pelarut	Titik didih (°C)	Titik beku (°C)	Konstanta dielektrik
Heksana	68	-94	1,8
Dietil eter	35	-116	4,3
Kloroform	61	-64	4,8
Etil Asetat	77	-84	6,0
Aseton	56	-95	20,7
Etanol	78	-117	24,3
Metanol	65	-98	32,6
Air	100	0	80,2

### 2.9.2 Pemisahan Senyawa

Teknik isolasi senyawa dapat diperoleh dengan menggunakan metode kromatografi. Metode kromatografi merupakan suatu cara untuk memisahkan senyawa berdasarkan partisi cuplikan antara fase gerak dan fase diam. Proses pemisahan terjadi karena sampel tertahan oleh fase diam atau dibawa oleh fase gerak dan tergantung pada afinitas senyawa terhadap kedua fase (Lenny, 2006)

Untuk memisahkan senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam jaringan tumbuhan, cara yang paling populer untuk menelaahnya adalah dengan menggunakan kromatografi kertas dua arah dari ekstrak etanol pekat dengan menggunakan pengembang BAA dan asam asetat 5%. Pembanding baku yang digunakan pada kromatogram dalam proses pemisahan senyawa golongan flavonoid ialah rutin, yaitu suatu glikosida flavonol (Harborne, 1987).

### 2.10 Mikronuklei

Mikronuklei merupakan sebuah nucleus kecil yang terbentuk saat kromosom atau fragmen kromosom yang tidak masuk kedalam salah satu nucleus sel baru saat pembelahan berlangsung (Fenech 2003). Dalam setiap sel makhluk hidup

terdapat inti sel atau nucleus yang di dalamnya terdapat berbagai materi-materi genetik yaitu *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) yang memiliki fungsi utama yaitu untuk mengadakan kontrol terhadap aktivitas sel (Moss 1980).

Beberapa studi telah dilakukan untuk tujuan mengevaluasi masuknya pestisida sebagai penyebab kerusakan menggunakan uji mikronuklei dalam eritrosit dari *P. parva*. Hal ini akan sangat membantu dalam memahami dasar dasar pengaruh ekotoksikologikal paparan pestisida terhadap fisiologi ikan dalam perairan dan mempelajari genotoksisitas (Huanyang dan Shihua 2016).

Terbentuknya sel mikronuklei dapat disebabkan oleh adanya interaksi dari agen kimia, fisik atau biologi dengan struktur non genomik, seperti mitotik spindle dan kinetokor yang akhirnya memicu gangguan dalam proses mitotik yang nantinya akan menyebabkan terjadinya gagal dan kesalahan saat proses pembelahan kromosom. Agen tersebut juga dapat secara langsung berdampak pada DNA, menimbulkan pecahnya kromosom, yang dapat terlihat secara visual dan dihitung melalui uji mikronukleus (Tatiana dan Carmem, 2006).

Mikronukleus digunakan untuk meninjau kerusakan sebuah kromosom atau seluruh kromosom pada organisme yang gagal menemukan jalan menuju benang spindle selama pembelahan sel. Pada tahap anaphase, saat elemen sentrik berpindah menuju spindle pole, kromatik sentrik dan fragmen kromosom tertinggal. Setelah tahap telophase, kromosom yang tidak rusak dan fragmen sentrik berubah menjadi nuclei seperti biasa. Meskipun elemen yang tertinggal ini juga termasuk dalam sel anak dan sebagian besar ditransfer ke dalam satu atau beberapa nuclei sekunder, yang jauh lebih kecil daripada nuclei dasar dan pada umumnya disebut sebagai "mikronukleus" (Gangar *et al.* 2010).

Mikronukleus assay dapat dijadikan rujukan untuk mengetahui tingkat kerusakan genetik pada suatu organisme. Kemampuan dari uji mikronukleus ini juga digunakan untuk mendeteksi dampak klastogenik dan aneugenik (mengarah

ke struktural dan angka perubahan kromosom). Perbedaan antara dua fenomena ini berdasarkan identifikasi asal mula micronuklei adalah penting untuk analisis mikronukleus ini digunakan untuk menguji genotoksisitas atau untuk biomonitoring paparan genotoksik dan dampak dalam berbagai sel (Attia *et al.* 2009). mikronukleus assay telah lama dipergunakan untuk melihat potensi genotoksik dari berbagai komponen pencemaran terhadap ikan. begitu juga untuk melihat potensi pencemaran yang diakibatkan oleh masuknya pestisida ke perairan. uji mikronukleus pada sel eritrosit ikan dari jenis tilapia adalah metode yang sensitif untuk mengevaluasi dan melihat komponen karsinogenik dan mutagen di lingkungan perairan. Naqvi *et. al.*, (2016)

## 2.11 Hematologi

Darah memiliki fungsi yang penting bagi organisme. Pada ikan, darah memiliki fungsi sebagai pembawa ion-ion anorganik ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) dan senyawa organik seperti hormon, vitamin, serta beberapa protein plasma. Protein plasma sendiri memiliki peran yang penting dalam respon kekebalan tubuh yaitu sebagai penyangga perubahan pH darah dan pengaturan tekanan osmotik (Bond, 1979).

Fungsi darah pada ikan untuk mengedarkan zat makanan hasil pencernaan dan oksigen ke sel-sel tubuh serta membawa hormon dan enzim ke organ yang memerlukannya. Beberapa parameter yang dapat memperlihatkan perubahan pada darah adalah kadar hematokrit (Ht), kadar hemoglobin (Hb), jumlah sel darah merah (leukosit) dan jumlah sel darah putih (leukosit)) (Lagler *et al.*, 1977).

### 2.11.1 Hematokrit

Hematokrit (Ht) merupakan perbandingan antara volume sel darah merah dengan plasma darah (Bond, 1979). Menurunnya kadar hematokrit dapat sebagai indikasi rendahnya protein dalam pakan, defisiensi vitamin atau ikan dapat infeksi, sedangkan meningkatnya kadar hematokrit menunjukkan ikan dalam keadaan



stress (Wedemeyer & Yasutake, 1977 dan Anderson & Siwick, 1983). Hematokrit dalam darah ikan mas pada kondisi normal adalah sebanyak 27,1% (Peter dan Cech, 1990 *dalam* Affandi dan Tang, 2002)

### 2.11.2 Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin terkandung dalam sel darah merah yang mana hemoglobin ini merupakan suatu protein dalam eritrosit. Hemoglobin berperan dalam proses pengangkutan oksigen dalam darah dan kadar hemoglobin dalam darah ikan berkaitan dengan jumlah eritrosit (Lagler *et al.*, 1977). Hemoglobin berkaitan dengan eritrosit yaitu kadar atau kandungan eritrosit matang dalam aliran darah. Rendahnya Hb menunjukkan ikan anemia, sedangkan tingginya Hb berkaitan dengan kondisi stres (Blaxhall, 1972).

Kadar hemoglobin dalam darah ikan teleostei berkisar antara 37-100% Hb setara dengan 14 gram dalam 100 ml darah dan dalam keadaan sakit akut kadar Hb pada ikan akan turun hingga 27 % (Lucky, 1977). Angka (1983), kadar hemoglobin pada ikan mas dewasa adalah  $8,61 \pm 0,43$  -  $10,86 \pm 48$  (gram per 100 cc volume darah).

### 2.11.3 Eritrosit

Warna eritrosit merah kekuningan, bentuk lonjong, kecil dan berukuran 7-36 mikron (Lagler *et al.*, 1977). Darah ikan sebagian besar terdiri dari sel-sel darah merah yang jumlahnya diperkirakan mencapai 4 juta sel/mm<sup>3</sup>. Sel darah merah ikan memiliki inti sel yang ukurannya bervariasi antar spesies. Sel darah merah tersebut mengandung hemoglobin dan berfungsi membawa oksigen dari insang ke berbagai jaringan (Moyle dan Cech, 1981).

Menurut Angka (1990) volume sel darah merah 100cc volume darah pada ikan mas dewasa berkisar  $30,92 \pm 0,43\%$  dan  $37,4 \pm 1,67\%$  dan jumlah sel darah merah per 1cc darah ikan mas  $(1,61 \pm 0,06) \times 10^6$  sel sampai  $(2,04 \pm 0,09) \times 10^6$

sel. Eritrosit yang terdapat dalam darah ikan mas dalam kondisi normal adalah 1,43 sel x 106/mm<sup>3</sup> (Peter dan Cech, 1990 *dalam* Affandi dan Tang 2002).

#### 2.11.4 Leukosit

Menurut Angka (1990), jumlah sel leukosit dalam 1cc darah merah ikan berkisar antara  $(14,70 \pm 0,32) \times 10^3$  sel –  $(19,35 \pm 0,42) \times 10^3$  sel. Affandi dan Tang (2002), sel darah putih pada ikan tidak berwarna dengan jumlah berkisar 20.000 – 150.000 butir, dan dibedakan menjadi dua golongan, yaitu: agranulosit dan granulosit. agranulosit digolongkan menjadi limfosit, monosit dan trombosit, seangkan granulosit dibagi menjadi basofil, eosonofil dan neutrofil.

#### 2.12 Histologi Jaringan Ikan

Histologi jaringan merupakan metode yang sensitif. Secara biologis, metode ini bernilai untuk mengukur dampak dari stres lingkungan terhadap jaringan tubuh yang terdapat pada hewan. Perubahan yang terjadi secara histologis dapat digunakan untuk memperkirakan dan menganalisis dampak yang mungkin terjadi pada organisme seperti laju pertumbuhan, reproduksi, aktifitas organisme dalam menghindarkan diri dari predator, dan stabilisasi populasi pada tingkat yang lebih tinggi (MacKim, 1985; Meyer dan Hendricks 1985; Connel dan Miller, 1995).

Beberapa studi yang dilakukan sebelumnya telah melaporkan bahwa terdapat beberapa perubahan dan kerusakan histopatologi pada insang ikan bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) yang dipapar pestisida diazinon dengan konsentrasi subletal menunjukkan beberapa kerusakan yang terjadi pada insang seperti ekstrusi mucus, pembengkakan lamella, serta menurunnya microridges (Dutta *et al.*, 1997). Pada ikan guppy (*Poecilia reticulata*) yang dipapar dengan pestisida klorpirifos, kerusakan insang juga terjadi antara lain mengecilnya lamella, terjadinya Fusi, hancurnya lamella secara total, meningkatnya vakuolasi, bentuk lamella insang yang tidak teratur (De Silva dan Samayawardhena, 2002).

### 3 Kerangka Penelitian

#### 3.1 Landasan Teori

Aplikasi penggunaan pestisida sebagai upaya dalam penanggulangan hama pengganggu secara tidak langsung dapat meningkatkan produksi hasil pertanian. Selain efek positif tersebut, tidak sedikit pula ditemukan dampak negatifnya terhadap organisme non target. Meskipun suatu jenis pestisida tertentu ditujukan untuk mematikan suatu kelompok atau spesies target tertentu, tetapi pada hakekatnya bersifat racun terhadap semua organisme baik organisme target maupun non target (Supriyono *et. al* 2005).

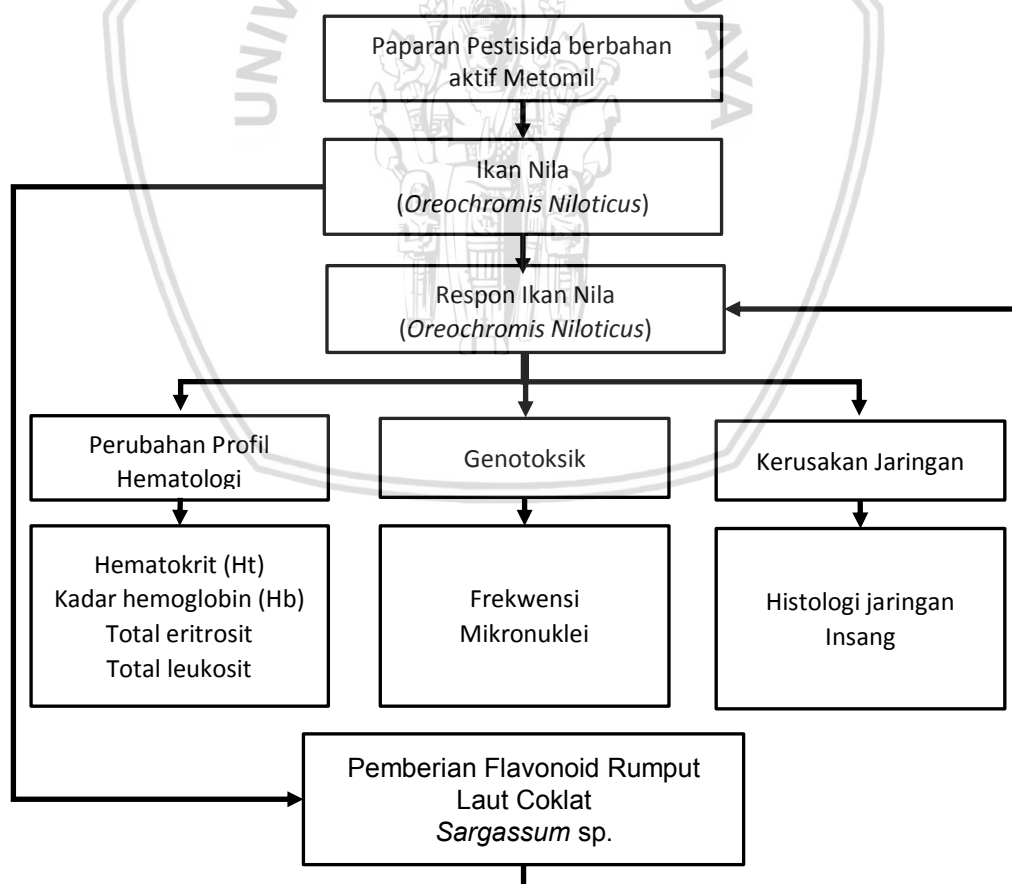
Pestisida akan terkonsentrasi dalam lingkungan perairan sehingga berpotensi mengganggu keseimbangan ekosistem perairan. Selain itu akan masuk ke dalam proses metabolisme organisme dan mempengaruhi biota yang dibudidayakan. Ikan merupakan salah satu hewan non target yang berpotensi terpapar oleh adanya pencemaran pestisida yang masuk ke lingkungannya. Dampak yang akan terjadi akibat adanya paparan dari pestisida di perairan ini akan mempengaruhi kondisi hematologi ikan nila. Ikan nila yang terpapar oleh pestisida akan terpengaruh dan dapat mengalami perubahan secara signifikan dalam 30 hari (Connel dan Miller, 1995; Madhusudan, 2016).

Dampak genotoksik yang ditimbulkan oleh paparan pestisida akan menyebabkan adanya sejumlah kerusakan kromosom atau terjadinya kesalahan fungsi suatu benang spindel yang nantinya akan terekspresi menjadi mikronuklei. Paparan pestisida juga dapat mempengaruhi terbentuknya radikal bebas dalam tubuh ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang akan menyerang membran sel. Hal ini nantinya menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel yang lambat laun akan merusak otot dan jaringan tubuh ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dalam jumlah besar (Abramson dan Vaccarino, 2002; Ramadhani, 2013).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman. Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidatif flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa golongan flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dan beragam pada berbagai jenis sereal, sayuran dan buah-buahan. Kapasitas penangkapan radikal bebas melalui uji DPPH oleh flavonoid adalah sebesar 85.6% of flavonoids dibandingkan polifenol 72.2% dan tannin sebesar 70% (Redha (2010); Chaouche *et al*, 2014).

### 3.2 Kerangka Konseptual Penelitian

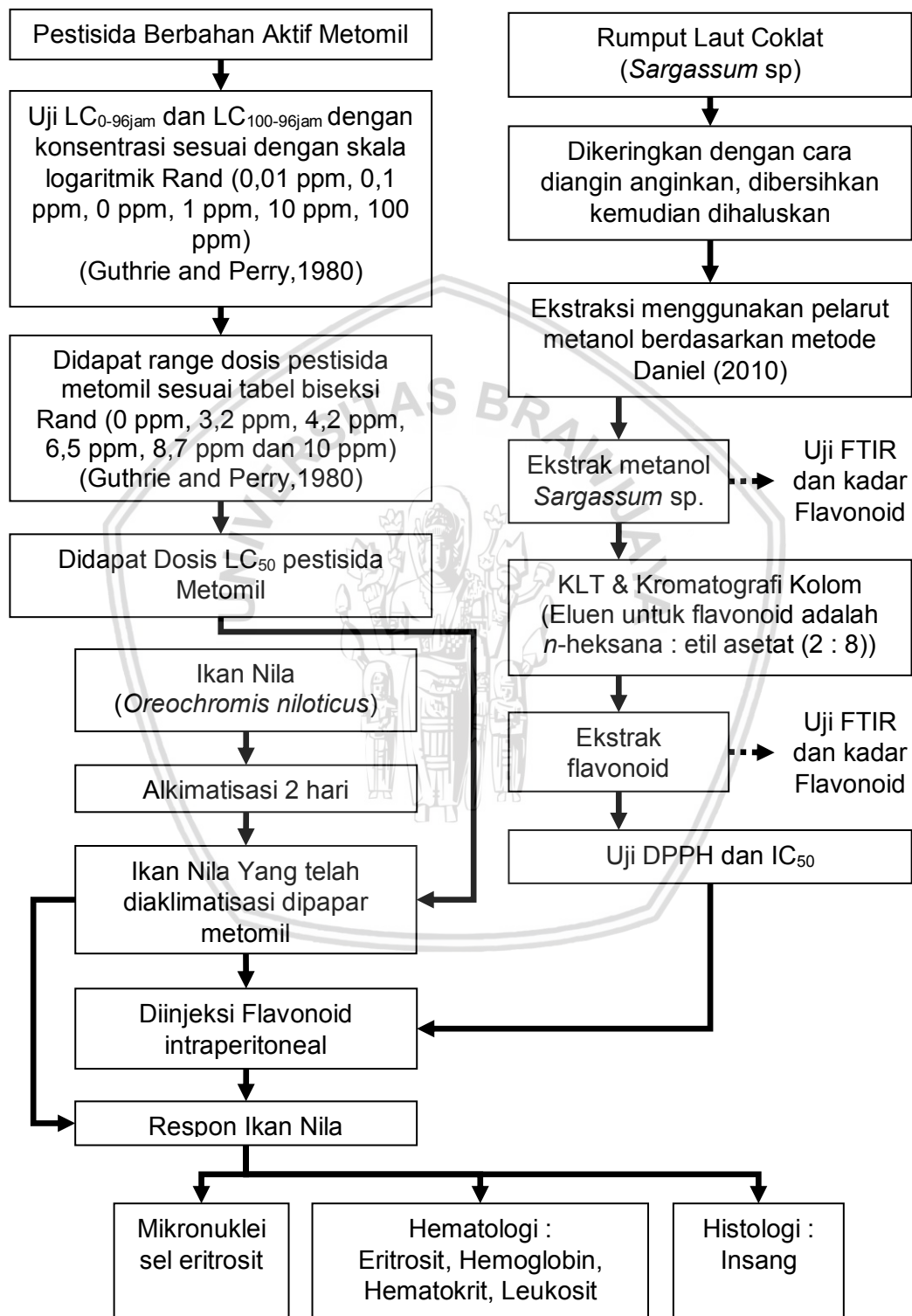
Kerangka konseptual dalam penelitian ini dapat dilihat pada gambar 4 di bawah:



Gambar 4. Kerangka Konseptual Penelitian

### 3.3 Kerangka Operasional Penelitian

Kerangka operasional dalam penelitian ini dapat dilihat pada gambar 5 di bawah:



Gambar 5. Kerangka Operasional Penelitian



### 3.4 Hipotesis

**H0** : Ada pengaruh paparan letal konsentrasi pestisida berbahan aktif metomil terhadap status hematologi, mikronuklei dan histologi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan ada pengaruh pemberian flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) terhadap hematologi, mikronuklei dan histologi ikan (*Oreochromis niloticus*) yang terpapar letal konsentrasi pestisida berbahan aktif metomil.

**H1** : Tidak ada pengaruh paparan letal konsentrasi pestisida berbahan aktif metomil terhadap status hematologi, mikronuklei dan histologi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan tidak ada pengaruh pemberian flavonoid laut coklat (*Sargassum* sp.) terhadap hematologi, mikronuklei dan histologi ikan (*Oreochromis niloticus*) yang terpapar letal konsentrasi pestisida berbahan aktif metomil.

### 3.5 Strategi Publikasi

Publikasi karya ilmiah dalam bentuk artikel jurnal penelitian merupakan salah satu tahapan setelah pelaksanaan penelitian. Publikasi menjadi salah satu persyaratan dalam kegiatan Pelaksanaan Kurikulum Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Kelautan dan Perikanan di Universitas Brawijaya. Publikasi nantinya haruslah pada Jurnal Nasional terakreditasi dan Jurnal Internasional. Adapun hasil penelitian yang didapat nantinya akan dipublikasikan dalam jurnal internasional yang dilihat pada Tabel 3. Dibawah:

**Tabel 3 Strategi Publikasi**

No	Judul	Bulan	Jurnal
1	Assessing the Genotoxic Potentials of Methomyl-based Pesticide in Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Using Micronucleus Assay	Desember 2017	The Journal of Experimental Life Science

## 4 Metodologi penelitian

### 4.1 Pendekatan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Metode eksperimen yaitu mengadakan observasi di bawah kondisi buatan (*artificial condition*), dimana kondisi tersebut diatur oleh peneliti dengan tujuan melihat suatu hasil yang menggambarkan hubungan kausal antara variabel-variabel yang diteliti (Kusriani *et al.*, 2012).

### 4.2 Prosedur Penelitian

#### 4.2.1 Pengambilan Sampel Ikan Nila

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah teknik pengambilan acak sederhana yaitu setiap individu spesies ikan nila (*Oreochromis niloticus*) memiliki kesempatan yang sama untuk menjadi sampel penelitian. Ikan nila yang diambil yaitu ikan nila hitam yang berukuran 9-12 cm. Pengambilan sampel ikan dilakukan dengan menggunakan jaring. Ikan yang didapat selanjutnya, dipelihara di laboratorium dengan wadah akuarium dan diberi perlakuan untuk kemudian dianalisis pengaruh flavonoid dan pestisida berbahan aktif metomil terhadap histologi, hematologi dan mikronuklei ikan nila.

#### 4.2.2 Uji Toksisitas Pestisida Berbahan Aktif Metomil

Pelaksanaan uji toksisitas diawali dengan tahap pemeliharaan (*holding*), kemudian dilanjutkan dengan aklimasi (*acclimation*), uji pendahuluan (*exploratory test*) dan uji sesungguhnya (*full-scale test*).

##### a. Pemeliharaan (*holding*)

Ikan nila uji dipindahkan dari lingkungan asal di mana ikan didapat ke dalam air kolam pemeliharaan yang ditempatkan dalam laboratorium dan dipelihara

selama 14 hari. Selama masa *holding* hewan uji diberi pakan komersil dengan frekwensi satu kali sehari. Hewan uji yang mati atau abnormal segera dibuang.

**b. Aklimasi (*acclimation*)**

Setelah masa *holding* 14 hari, ikan nila pindahkan ke dalam aquarium penelitian yang berukuran 60 x 30 x 25 sentimeter untuk diaklimatisasi agar beradaptasi dengan keadaan fisik aquarium penelitian. Masing masing aquarium diisi dengan 10 ekor ikan nila dengan ukuran panjang ikan 9-12 sentimeter dan diberi aerasi.

Aklimatisasi dilakukan selama 2 hari sebelum diberi perlakuan. Apabila dalam waktu 48 jam lebih dari 3% populasi hewan uji mati, maka populasi ikan nila yang akan diberi perlakuan dianggap tidak memenuhi syarat untuk pengujian. Ikan nila yang mati diganti dengan ikan nila baru yang diambil dari kolam pemeliharaan (Kolam *Holding*) lalu dilakukan aklimatisasi kembali selama 2 hari. Proses ini dilakukan sampai ikan nila uji tidak ada yang mati atau abnormal.

**c. Uji pendahuluan (*exploratory test*)**

Sebelum dilakukan uji pendahuluan, ikan nila yang telah diaklimatisasi kemudian dipuasakan selama 1 hari untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Selama ikan dipuasakan, air aquarium dibersihkan dari sisa pakan atau feses dengan cara disifon. Setelah masa dipuasakan, kemudian ikan nila diberi perlakuan uji pendahuluan.

Perlakuan uji pendahuluan dilakukan dengan memasukkan pestisida metomil ke dalam masing-masing bejana uji dengan beberapa variasi konsentrasi. Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui kisaran konsentrasi yang tepat untuk digunakan dalam uji toksisitas sesungguhnya. Pada uji pendahuluan ini konsentrasi yang digunakan adalah 0 mg/lit, 0,001 mg/lit, 0,01 mg/lit, 0,1 mg/lit, 1 mg/lit, 10 mg/lit, dan 100 mg/lit (Guthrie and Perry, 1980). Uji ini dilakukan sebanyak 3x ulangan.

Selama masa uji pendahuluan, dilakukan pengamatan pola aktivitas hewan (meliputi frekuensi pernafasan, pola gerak, dan *escape reflex*) mulai dari 0 jam sampai dengan 96 jam. Penentuan  $LC_{50-96}$  jam dilakukan dengan pendekatan analisis probit.

**d. Uji sesungguhnya (*full-scale test*)**

Berdasarkan nilai  $LC_{50-96}$  jam uji pendahuluan, dilakukan uji toksisitas dengan cara yang sama tetapi dengan variasi konsentrasi yang lebih sempit di sekitar  $LC_{50-96}$  jam uji pendahuluan dengan berdasarkan pada skala logaritmik yang dikemukakan oleh Rand (Guthrie and Perry, 1980). Ikan yang digunakan dalam uji sesungguhnya adalah ikan baru yang diambil dari kolam *holding* dan telah dilakukan diaklimatisasi dengan aquarium uji. Pada tahap uji sesungguhnya ini dilakukan juga pengamatan pola aktivitas hewan uji (meliputi frekuensi pernafasan, pola gerak, dan *escape reflex*) serta pengukuran parameter kualitas air uji. pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam

Variasi konsentrasi progresif bahan pencemar pada skala logaritmik yang banyak digunakan sebagai acuan dalam dalam uji toksisitas dapat dilihat pada tabel 4 dibawah:

Tabel 4. Variasi konsentrasi progresif bahan pencemar uji toksisitas pada skala logaritmik (modifikasi dari Bowman dan Rand, 1980)

Kolom 1	Kolom 2	Kolom 3	Kolom 4	Kolom 5
10,0				
				8,7
			7,5	
				6,5
		5,6		
			4,2	
			3,7	
	3,2			
			2,4	
				2,1
		1,8		
			1,35	
				1,15
1,0				

Berdasarkan tabel konsentrasi progresif di atas, dipilih konsentrasi 0 ppm (kontrol); 3,2 ppm; 4,2 ppm; 6,5 ppm; 8,7 ppm dan 10 ppm sebagai konsentrasi pengujian tingkat toksisitas metomil dan dilakukan sebanyak 3x ulangan. Setelah 96 jam perlakuan, Ikan pada tiap konsentrasi uji dilakukan pengambilan sampel hematologi, mikronuklei dan histologi organ insang. Hasil yang didapat kemudian dilakukan analisis probit menggunakan metode Bosvine-Nash (Kastoeni, 1985) untuk menduga nilai LC-50 dari pestisida berbahan aktif metomil.

Dalam uji toksisitas sesungguhnya, dilakukan aerasi pada setiap bejana uji. Pemberian aerasi bertujuan agar diperoleh hasil yang lebih akurat karena efek yang terjadi betul-betul disebabkan oleh bahan uji (pestisida metomil), bukan karena kekurangan oksigen selama masa pengujian.

#### **4.2.3 Pengolahan Rumput Laut *Sargassum* sp.**

Sebelum dilakukan proses ekstraksi, rumput laut coklat dari jenis *Sargassum* sp. dilakukan beberapa proses yang pertama adalah rumput laut diambil dari lokasi budidaya kemudian dilakukan proses pencucian, pengeringan, penggilingan, dan ekstraksi. Pemilihan rumput laut yang akan di ekstraksi juga perlu dilakukan. Hal ini untuk menghindari adanya pencemaran oleh tumbuhan atau organisme lainnya. Dengan kata lain, rumput laut yang akan diektrak haruslah tidak berpenyakit, yaitu yang tidak terjangkit virus, bakteri atau jamur. Bukan saja hasil sintetis mikroba yang mungkin terdeteksi, tetapi infeksi pun mungkin mengubah metabolisme tumbuhan secara serius dan membentuk hasil yang tidak diharapkan, bahkan mungkin dalam jumlah besar. (Harborne, 1987)

Menurut Meenakshi (2009), rumput laut coklat di cuci dengan menggunakan air laut perairan tempat diambilnya rumput laut untuk membersihkannya dari kotoran, lumut, lumpur, dan pasir. kemudian dibawa ke laboratorium menggunakan kantong plastik berisi air untuk mencegah evaporasi. sampel



selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin anginkan di tempat yang terhindar dari sinar matahari langsung hingga mencapai berat konstan lalu di haluskan menggunakan blender. bubuk sampel lalu disimpan dalam lemari es untuk mempertahankan mutunya.

#### 4.2.4 Ekstraksi Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.)

Aglikon flavonoid adalah polifenol dan oleh karena itu, flavonoid mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Karena flavonoid merupakan senyawa polar, pada penelitian ini, pelarut yang digunakan adalah pelarut polar yaitu metanol (MeOH). Flavonoid merupakan senyawa polifenol sehingga bersifat kimia senyawa fenol yaitu agak asam dan dapat larut dalam basa, dan karena merupakan senyawa polihidroksi (gugus hidroksil) maka juga bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol (Markham, 1988).

Rumput laut kering giling yang telah dipersiapkan sebelumnya, kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi untuk menghasilkan ekstrak dari *Sargassum* sp. kering dengan menggunakan pelarut metanol. *Sargassum* sp. kering giling dimasukkan ke dalam beaker glass sebanyak 1000 gr bersama dengan pelarut hingga terendam. Pelarut yang digunakan adalah metanol. Perbandingan bahan dan pelarut 1:2 (w/v). kemudian tutup beaker glass dengan rapat dan dibiarkan selama 24 jam dengan di shaker menggunakan shaker digital dengan kecepatan 50 rpm.

Setelah 24 jam, sampel disaring menggunakan kain blacu kemudian dilanjutkan penyaringan dengan menggunakan kertas Watmann no.1 (Meenakshi *et. al*, 2009) untuk memisahkan filtrat dan ampasnya. Proses maserasi dilakukan berulang kali sampai diperoleh larutan yang bening. Hasil maserasi disaring dan dipekatkan dengan rotary evaporator selama 5 jam. Ekstrak yang diperoleh

disebut sebagai ekstrak metanol. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuapkan dalam waterbath selama 2 jam.

#### 4.2.5 Uji Fitokimia

Identifikasi fitokimia dilakukan terhadap ekstrak methanol *Piper crocatum* yang menghasilkan kuantitas total fenol terbaik dengan memakai metode Harborne (1996) dengan langkah sebagai berikut:

##### 1. Uji alkaloid

2 ml HCL dicampurkan ke dalam 5 ml ekstrak daun *Piper crocatum* kemudian reagen Dragendroff ditambahkan ke dalamnya. Ekstrak positif mengandung alkaloid apabila terlihat warna merah atau oranye pada campuran tersebut.

##### 2. Uji steroid

Dilartutkan ekstrak daun *Piper crocatum* sebanyak 1 ml ke dalam 10 ml kloroform dan ditambahkan 10 ml asam sulfur. Ekstrak yang positif mengandung steroid, jika disinari dengan green fluoroscene maka akan terlihat lapisan asam sulfur berwarna kuning dan lapisan atas berwarna merah.

##### 3. Uji flavonoid

Ditambahkan beberapa tetes sodium hidroksida ke dalam 1 ml ekstrak daun *Piper crocatum*. Jika ekstrak positif mengandung flavonoid maka setelah ditetesi asam maka warna kekuningan pada ekstrak akan hilang.

##### 4. Uji Tanin

Ditetesi 1% lead asetat ke dalam 5 ml ekstrak daun *Piper crocatum* Ekstrak positif mengandung tanin jika terbentuk warna kuning di dalamnya.

##### 5. Uji Terpenoid

Ditambahkan 2 ml kloroform ke dalam 0.5 g ekstrak *Piper crocatum*. Kemudian dimasukkan 3 ml asam sulfat sedikit demi sedikit hingga terbentuk

lapisan berwarna. Ekstrak yang positif mengandung terpenoid akan menunjukkan warna merah kecoklatan.

## 6. Uji Saponin

Ditambahkan 5 ml aquades ke dalam tabung reaksi berisi 0.5 gram ekstrak daun *Piper crocatum* kemudian dihomogenkan. Selanjutnya minyak zaitun sebanyak 3 tetes ditambahkan ke dalamnya lalu dikocok. Ekstrak positif mengandung saponin jika terbentuk emulsi.

### 4.2.6 Pengukuran Total Flavonoid

Penentuan total flavonoid ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dilakukan untuk mengetahui prosentase kandungan flavonoid total dalam ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp) menggunakan metode *kolorimetri* aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) dengan pengukuran absorbansi secara spektrofotometri. Metode yang digunakan yaitu metode aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ). Pemilihan metode ini didasarkan pada senyawa flavonoid yang akan dianalisis. Chang *et al.* (2002) menjelaskan bahwa prinsip dari metode ini adalah  $\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu  $\text{AlCl}_3$  juga akan membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus ortodihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid. Dalam penelitian ini, pembuatan kurva standar dilakukan dengan menggunakan kuersetin sehingga kadar flavonoid total dari ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) yang didapat pada penelitian ini dinyatakan dalam satuan miligram kuersetin per gram ekstrak (mg QE/g ekstrak).

#### a) Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Kuersetin 10 mg dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut metanol hingga tanda (kadar kuersetin menjadi 1mg/mL atau 1000 $\mu\text{g/mL}$ ). Lalu larutan induk 1000 $\mu\text{g/mL}$  diambil sebanyak 1 mL dilarutkan dalam labu takar 10 mL

dengan pelarut metanol hingga tanda (kadar kuersetin menjadi 100 $\mu$ g/ml). Dibuat kurva baku dari larutan induk 100 $\mu$ g/ml dengan cara memipet 0,5 ; 1,0 ; 1,5 dan 2,0 mL, dilarutkan ke dalam 10 mL dengan pelarut etanol (kadar larutan standart menjadi 5 ; 10 ; 15 ; dan 20  $\mu$ g/mL).

Sebanyak 0,5 mL dari masing-masing konsentrasi larutan direaksikan dengan 2 ml akuades dan 0,15 ml NaNO<sub>2</sub> 5 % kemudian didiamkan selama 6 menit. Menambahkan sebanyak 0,15 mL AlCl<sub>3</sub> 10% kedalam larutan, kemudian didiamkan kembali selama 6 menit. Larutan direaksikan dengan 2 mL NaOH 4%, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume total 5 mL dan didiamkan 15 menit. Diukur absorbansi larutan standart pada panjang gelombang 510 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Kurva standart diperoleh dari hubungan antara konsentrasi kuersetin ( $\mu$ g/ml) dengan absorbansi.

#### **b) Absorbansi Ekstrak**

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam labu ukur 10 ml dengan pelarut metanol hingga tanda (kadar ekstrak menjadi 1mg/mL atau 1000 $\mu$ g/mL). Lalu larutan induk 1000 $\mu$ g/mL diambil sebanyak 0,5 mL direaksikan dengan 2 ml akuades dan 0,15 ml NaNO<sub>2</sub> 5 % kemudian didiamkan selama 6 menit. Sebanyak 0,15 mL AlCl<sub>3</sub> 10% ditambahkan kedalam larutan, kemudian didiamkan kembali selama 6 menit. Larutan direaksikan dengan 2 mL NaOH 4%, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume 5 mL dan didiamkan 15 menit. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 510 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

#### **4.2.7 Isolasi Senyawa Bioaktif Flavonoid**

Prinsip dari pemisahan (isolasi) flavonoid ini adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian),

kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk labus (adsorpsi, penyerapan) (Harborne, 1987).

Isolasi golongan flavonoid dilakukan dengan kromatografi kolom pada fase diam berupa silica gel G<sub>60</sub> dan fase gerak metanol : etil asetat (1:8, v/v) ±100 ml. Silica gel ditimbang ± 20 mg kemudian disuspensikan ke dalam fase gerak metanol ; etil asetat (1:8, v/v) ±50 ml dan diaduk dengan magnetic stirrer selama 1 jam agar pada saat silica gel dimasukan ke dalam kolom tidak retak. Pada ujung kran gelas kolom (50ml) diisi kapas kemudian kolom dipasang pada statif dan diisi fase gerak untuk membasahi kapas. Tahap selanjutnya, kolom diisi fase gerak secara perlahan melalui dinding kolom hingga penuh. Kemudian bubuk silica gel dimasukan ke dalam kolom sampai isi kolom terbentuk sempurna dan silica gel dalam kolom mencapai  $\frac{3}{4}$  tinggi kolom. Tahap selanjutnya, pasir laut dimasukan dalam kolom agar pelarut tidak mengenai silica gel dan sebagai penyaring saat sampel dimasukan.

Filtrat pekat rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) yang didapat selanjutnya dilarutkan kedalam 0.5 ml metanol ; etil asetat (2 : 8, v/v), kemudian dimasukan ke dalam kolom secara perlahan agar tidak merusak silica gel. Kran pada kolom dibuka secara perlahan, kemudian larutan pita warna flavonoid ditampung dalam tabung reaksi. Tambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar silica gel tidak kering. Lakukan isolasi flavonoid berdasarkan prosedur tersebut sampai didapatkan jumlah larutan yang diinginkan. Larutan flavonoid kemudian diperkatkan dalam nitrogen evaporator pada suhu 40-45 °C sehingga didapatkan ekstrak flavonoid kering. Ekstrak flavonoid tersebut kemudian dimasukan kedalam botol yang telah dilapisi alumunium foil.



#### 4.2.8 Uji IC<sub>50</sub> Flavonoid

Aktifitas antioksidan dari flavonoid diuji dengan menggunakan stable radical chromogen 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazide photometric assay. Aktifitas antioksidan diidentifikasi berdasarkan pada kemampuannya dalam menetralkan radikal DPPH dibandingkan dengan antioksidan standar (vitamin C dan Trolox). 1 µl dan 0,5 µl larutan DPPH-ethanol dicampurkan dengan 0.25 ml flavonoid. Dalam 10 menit setelah proses pencampuran, diukur absorbansi pada 517 nm yang kemudian dibandingkan dengan larutan blanko (tanpa flavonoid) menggunakan spektrofotometri (Shimadzu UV-1202 UV-Vis spectrophotometer). Aktifitas DPPH radical scavenging flavonoid dihitung menggunakan rumus :

$$\text{DPPH radical scavenging rate (\%)} = (\text{ABS}_0 - \text{ABS}_t) / \text{ABS}_0 \times 100\%$$

Dimana ABS<sub>0</sub> adalah absorbansi dari larutan blanko (t = 0 menit) dan ABS<sub>t</sub> adalah absorbansi dari larutan sampel yang diuji keberadaan flavonoidnya. Uji IC<sub>50</sub> ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

#### 4.2.9 Perlakuan Pemberian Pestisida dan Flavonoid

Aquarium penelitian yang akan digunakan sebelumnya ditreatment terlebih dahulu dengan diberi 5 ml clorin per 50 liter dan dibiarkan selama 3 hari. Hal ini bertujuan untuk membersihkan wadah dari penyakit dan kotoran. Kemudian ditambahkan 5 ml Na-thiosulfat untuk menghilangkan efek dari pemberian clorin.

Langkah selanjutnya, ikan nila berukuran 9-12 cm diambil dari kolam holding dan dipindahkan ke aquarium penelitian untuk diaklimatisasi selama 2 hari. Setelah 2 hari masa aklimatisasi, selanjutnya ikan dipuasakan selama 1 hari. Kemudian ikan nila dipapar dengan pestisida metomil dengan konsentrasi sesuai dengan LC<sub>50</sub> yang didapat dari uji toksisitas sesungguhnya. Setelah 24 jam dan 48 jam pasca pemberian senyawa flavonoid, diamati parameter hematologi,

mikronuklei dan histologi ikan (Naqvi *et al* 2016). Setelah pemaparan, ikan lalu dipindahkan ke media baru tanpa pestisida dan berikan senyawa flavonoid sesuai dengan konsentrasi  $IC_{50}$ . Setelah 24 jam dan 48 jam pasca pemberian senyawa flavonoid, diamati parameter hematologi, mikronuklei dan histologi ikan.

### **4.3 Parameter Hematologi**

#### **4.3.1 Hematologi**

Hewan uji yaitu ikan nila berukuran 9-12 cm sejumlah 40-50% dari populasi dipisahkan untuk diambil sampel darahnya, sebelum dilakukan pengambilan darah ikan tersebut dipuasakan  $\pm 48$  jam. Menurut Harikrishnan *et al.*, (2011), untuk menghindari penggumpalan darah saat pengambilan maupun penyimpanan maka spuit suntik dan tube darah diberi anti koagulan Na.citrat 3,8% sebanyak 0,1 ml. Setelah ikan pingsan, pengambilan darah dilakukan pada pangkal ekor (antara sirip ekor dengan gurat sisi) menggunakan spuit suntik ukuran 1 ml dengan ujung jarum mengarah pada bagian bawah tulang punggung dengan kemiringan dibawah  $45^{\circ}C$ . Darah yang telah diambil dimasukkan pada tube darah dan disimpan di lemari pendingin. Sampel selanjutnya dilakukan pengukuran total eritrosit (TE), kadar hemoglobin (Hb), kadar hematokrit (Hc) dan total leukosit (TL).

#### **4.3.2 Pengukuran total eritrosit (TE)**

Prosedur pengukuran total eritrosit (TE) dilakukan berdasarkan Blaxhall dan Daisley (1973). Sampel darah diambil menggunakan pipet thoma eritrosit sampai skala 1, selanjutnya darah dilakukan pengenceran dengan larutan HAYEM sampai skala 101 untuk melisiskan sel leukosit dan trombosit sehingga memberikan kemudahan dalam perhitungan jumlah sel eritrosit. Setelah penambahan larutan HAYEM, selanjutnya dilakukan pengadukan dengan menggoyangkan pipet yang sama selama 3–5 menit hingga darah dan larutan HAYEM tercampur rata.

Tetesan pertama dibuang dan tetesan berikutnya ditetaskan pada hemositometer lalu ditutup dengan *cover glass* dan diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x. Penghitungan TE dilakukan pada lima kotak kecil pada hemositometer dengan persamaan sebagai berikut :

$$TE = \sum \text{eritrosit} \times 1/(\text{volume kotak}) \times \text{faktor pengenceran}$$

#### 4.3.3 Pengukuran Kadar Hemoglobin (Hb)

Pengukuran kadar Hb dilakukan berdasarkan metode Sahli dengan menggunakan sahlinometer (Wedemeyer dan Yasutake 1977). Sampel darah dihisap menggunakan pipet Sahli hingga skala 20 mm<sup>3</sup> atau 0,2 ml, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung Hb-meter yang telah diisi dengan HCl 0,1 N sampai skala 10 (merah), lalu dilakukan pengadukan dan didiamkan selama 3–5 menit. Setelah itu, akuades dimasukkan ke dalam tabung Hb-meter hingga terjadi perubahan warna seperti larutan standar pada Hb-meter. Skala dibaca dengan melihat permukaan cairan dan dicocokkan dengan skala tabung Sahli yang dilihat pada skala jalur % (kuning) yang berarti banyaknya Hb per 100 ml darah.

#### 4.3.4 Pengukuran Kadar Hematokrit (Hc)

Pengukuran Kadar Hc dilakukan dengan cara mengambil sampel darah menggunakan tabung mikrohematokrit kemudian disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Kadar hematokrit dalam sampel diketahui dengan membandingkan panjang sel darah yang mengendap dengan panjang total volume darah pada tabung mikrohematokrit (Anderson & Siwicki 1995) :

$$\text{Hematokrit} = (\text{volume sel darah merah}) / (\text{total volume darah}) \times 100$$

#### 4.3.5 Pengukuran Total Leukosit (TL)

Prosedur pengukuran TL dilakukan menurut Blaxhall dan Daisley (1973). Sampel darah diambil menggunakan pipet yang berisi bulir berwarna putih sampai skala 0,5, kemudian ditambahkan larutan Turk sampai skala 11, lalu dilakukan pengadukan dengan menggoyangkan pipet selama 3–5 menit hingga darah dan larutan Turk's tercampur rata. Tetesan pertama dibuang dan tetesan berikutnya ditetaskan pada hemositometer, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Penghitungan TL dilakukan pada empat kotak besar dalam hemositometer menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$TL = \sum \text{leukosit} \times 1/(\text{volume kotak}) \times \text{faktor pengenceran}$$

#### 4.4 Parameter Histologi Ikan Nila

Prosedur pengamatan histologi ikan nila uji dilakukan dengan cara membedah ikan untuk mengambil organ insang dan ginjal ikan. Sampel organ ikan kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel yang sudah berisi formalin 10% untuk menjaga supaya organ insang tidak rusak.

##### 4.4.1 Prosedur Pembuatan Preparat Histologi

Pengambilan organ insang ikan dilakukan dengan cara membedah operkulum ikan kemudian insang diambil dan diawetkan menggunakan formalin 10%. Pembuatan preparat histologi dapat dilakukan dengan cara dengan metode parafin yaitu dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Preparat yang dihasilkan didokumentasikan kemudian diamati secara visual untuk melihat kerusakan mikroanatomi insang dan ginjal ikan sebagai indikator paparan pestisida berbahan aktif metomil.

Tahapan pembuatan preparat histologi pertama tama organ insang difiksasi dengan larutan bouin's selama 24 jam. Lalu dilakukan proses dehidrasi dengan cara direndam pada alkohol 70 selama  $\pm$  24 jam dan selanjutnya direndam dalam alkohol 80%, 95%, 100%, xylol + alkohol (3:1), xylol + alkohol (1:1), xylol masing-masing selama  $\pm$  30 menit. Kemudian dilakukan tahap parafinasi dengan merendam jaringan menggunakan paraffin xylol, paraffin I, paraffin II, paraffin III dalam oven berushu 50-60 °C selama 30 menit. Selanjutnya jaringan insang tersebut dilakukan embedding atau pegeblokan dengan cara memasukan jaringan dalam cetakan berisi paraffin cair. Jaringan insang kemudian didinginkan hingga mengeras dalam suhu kamar selama  $\pm$  24 jam.

Setelah proses parafinasi, selanjutnya dilakukan tahap deparafinasi dengan cara memotong blok paraffin yang berisi jaringan menggunakan microtome dengan ketebalan 5 mikron. Jaringan yang dipotong diletakan di air hangat untuk mencegah hasil pemotongan melengkung selanjutnya diletakan di atas gelas objek dan dikeringkan sampai jaringan menempel sempurna pada permukaan gelas objek. Preparat potongan jaringan kemudian dicelupkan secara berturut-turut pada larutan xylol, alkohol 100%, 95%, 80% dan 70% masing-masing selama  $\pm$  5 menit lalu dicelupkan di dalam akuades selama 5 menit untuk selanjutnya dilakukan tahap pewarnaan. Pada tahap pewarnaan, preparat potongan jaringan dicelupkan dalam pewarna haemotoksilin selama 5 -10 menit kemudian di bilas dengan air mengalir. Preparat potongan jaringan kemudian dicelupkan ke dalam eosin selama 5-10 menit lalu dibilas dengan air mengalir

Selanjutnya, preparat dilakukan tahap dehidrasi dengan mencelupkan kembali preparat potongan jaringan dicelupkan pada larutan etanol 70%, 80%, 95% dan 100% selama 3-5 menit secara berturut-turut dan dilanjutkan dengan alkohol absolute selama 3 menit. Preparat potongan jaringan selanjutnya dicelupkan dalam xylol selama 5 menit.



Kemudian, dilanjutkan pada tahap mounting dengan mengelem preparat menggunakan DPX mounting medium. Kemudian ditutup dengan cover glass dan dihindari adanya gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruang sampai lem mengering kemudian diamati di bawah mikroskop. Dengan pewarnaan W, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh haematoksilin yang bersifat netral, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh eosin yang bersifat asam.

#### 4.5 Uji Mikronukleus pada sel darah ikan

Sampel darah perifer diperoleh dari vena kaudal dari sampel ikan dan dioleskan pada slide yang bersih. Setelah difiksasi dalam etanol murni selama 20 menit, slide dibiarkan kering udara dan kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Giemsa 10% selama 25 menit. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop "Olympus CX21".

Lima slide yang telah dibuat dari masing-masing sampel ikan diambil 1.000 eritrosit lalu dilakukan scoring dari setiap slide melalui pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X untuk menentukan frekuensi inti berlekuk, inti lobed, pemula, memecah-belah dan juga sel mikronukleus, yang nantinya dihitung sebagai sel per 1000 (‰) (Guner, 2011). Diamati tiap sel dan dihitung frekuensi mikronukleus dengan menggunakan rumus dari Betancur *et. al* (2009) sebagai berikut:

$$\text{Frekuensi mikronukleus} = \frac{\text{mikronukleus} \times (1000)}{\text{Total sel yang dihitung}}$$

#### 4.6 Parameter Penunjang

Pengukuran parameter kualitas air bertujuan sebagai penunjang agar data yang didapat nantinya benar benar akurat. Parameter fisika kimia air yang diamati pada uji toksisitas adalah Suhu, pH, DO dan Total Amonia Nitrogen.

#### 4.6.1 Suhu

Pengukuran suhu menggunakan termometer berdasarkan SNI 06-6989.23-2005 yaitu dengan cara mencelupkan langsung termometer pada media air pemeliharaan ikan nila uji dan biarkan 2 menit sampai dengan 5 menit sampai termometer menunjukkan nilai yang stabil kemudian catat pembacaan skala termometer (dalam °C) tanpa mengangkat lebih dahulu termometer dari air.

#### 4.6.2 Derajat Keasaman air (pH)

Pengukuran derajat keasaman air dilakukan dengan menggunakan pH meter berdasarkan SNI 06-6989.11-2004. Lakukan kalibrasi alat pH-meter dengan larutan penyangga sesuai instruksi kerja alat setiap kali akan melakukan pengukuran dengan cara keringkan pH meter dengan menggunakan kertas tisu selanjutnya bilas elektroda dengan air suling. Bilas elektroda dengan contoh uji. Celupkan elektroda ke dalam contoh uji sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap. Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter.

#### 4.6.3 Oksigen terlarut (DO)

Pengukuran oksigen terlarut dilakukan secara *in situ* dengan menggunakan DO meter. DO meter terlebih dahulu dikalibrasi dengan aquades kemudian air sampel diambil menggunakan wadah. Masukkan DO meter sampai batas yang telah ditentukan. Biarkan beberapa saat kemudian angkat dan baca nilainya.

#### 4.6.4 Total Amonia Nitrogen (TAN)

Untuk mengetahui konsentrasi total ammonia nitrogen dalam air media pemeliharaan ikan nila yang diuji, dilakukan metode pengecekan dengan menggunakan prinsip spektrofotomerik yang dilakukan di laboratorium. Supaya dapat terbaca oleh spektrofotometer, amonia dalam 10 ml air sampel yang telah

disaring harus direaksikan terlebih dahulu dengan 0.5 ml senyawa fenol dan 0.5 ml sodium nitroprusid kemudian dihomogenkan, lalu direaksikan kembali dengan *oxidizing reagent* sebanyak 1 ml dan dihomogenkan kembali. Setelah itu, tabung reaksi yang digunakan untuk melakukan reaksi tersebut ditutup rapat dan didiamkan selama satu jam. Lalu absorbansi warna air contoh (biru) diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 640 nm. Warna biru yang ditimbulkan merupakan akibat terbentuknya senyawa indofenol. Kemudian absorbansi air contoh disesuaikan dengan absorbansi akuades (blanko) dan konstanta perhitungan Stirling *et al.*, (1985).

$$[TAN]_{ppm} = \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi blanko}}{\text{Absorbansi standar} - \text{Absorbansi blanko}} \times \text{konsentrasi larutan standar}$$

#### 4.7 Rancangan percobaan

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 4 perlakuan dosis flavonoid berbeda dan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Menurut Sastrosupadi (2000) rancangan ini digunakan apabila dalam sebuah percobaan mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogeny. Model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dapat dilihat pada tabel 5 sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \sum_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = Nilai tengah umum

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\sum_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

t = Perlakuan

r = Ulangan

**Table 5. Model Rancangan Percobaan**

Perlakuan	Dosis Flavonoid	Ulangan			Total	Rata-Rata
		1	2	3		
<b>A</b>	<b>0</b>	A1	A2	A3	AT	AR
<b>B</b>	<b>1/3 IC<sub>50</sub></b>	B1	B2	B3	BT	BR
<b>C</b>	<b>2/3 IC<sub>50</sub></b>	C1	C2	C3	CT	CR
<b>D</b>	<b>3/3 IC<sub>50</sub></b>	D1	D2	D3	DT	DR

Langkah selanjutnya ialah membandingkan antara F hitung dengan F tabel :

- Jika F hitung < F tabel 5%, maka perlakuan tidak berbeda nyata.
- Jika F hitung > F tabel 1%, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.
- Jika F tabel 5% < F hitung < F tabel 1 %, maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata (F hitung > F tabel 5 %) maka dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan yang terbaik.

#### 4.8 Variabel penelitian

Variabel-variabel yang diteliti terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat., yaitu Variabel bebas meliputi adalah Dosis Flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) yang terdiri dari : A = Dosis Flavonoid 0; B = Dosis Flavonoid 1; C = Dosis Flavonoid 2; D = Dosis Flavonoid 3. Sedangkan Variabel terikat yaitu meliputi hematologi mikronuklei dan histologi ikan.

#### 4.9 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis satu arah yang disebut One Way Anova. Analisis ini dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diamati. Jika hasil

sidik ragam diketahui bahwa perlakuan pada penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda nyata atau sangat nyata maka dilakukan uji lanjutan yang disebut Uji BNT. Hal ini dilakukan untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan respon beda nyata sehingga dapat dilanjutkan dengan regresi dan korelasi.

#### 4.10 Jadwal Rencana Penelitian

Rencana penelitian akan dilakukan di Laboratorium Budidaya ikan divisi Parasit dan Penyakit Ikan Universitas Brawijaya, divisi Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, pada bulan Mei – September 2017. Jadwal rencana penelitian disajikan dalam tabel 7 sebagai berikut :

**Table 6. Jadwal Rencana Penelitian**

No	Kegiatan	Mei				Juni				Juli				Agustus				September			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Penyusunan Proposal																				
2	Persiapan																				
3	Penelitian																				
4	Pengolahan Data																				
5	Penyusunan Laporan																				



## 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

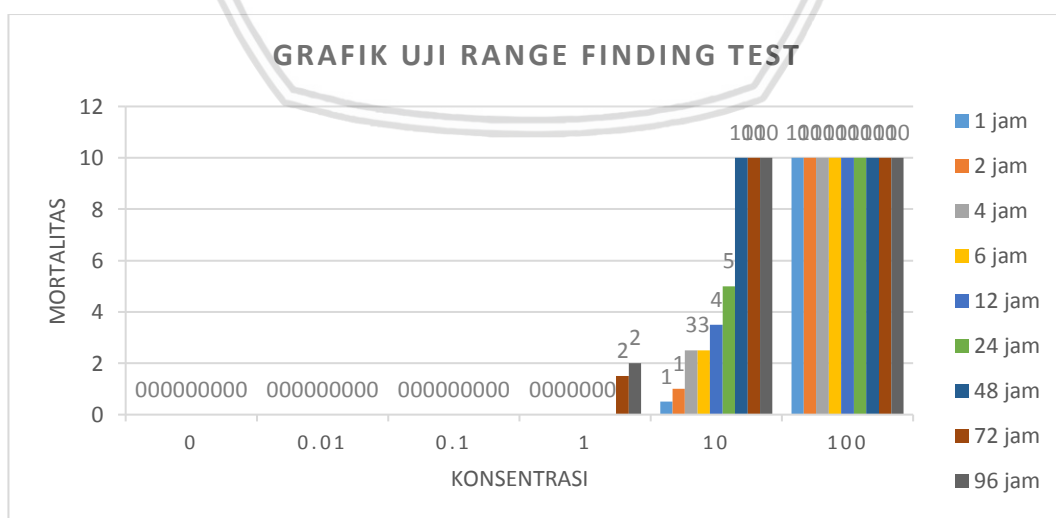
### 5.1 Uji Toksisitas

Uji toksisitas pestisida berbahan aktif metomil dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama adalah uji penentuan kisaran (*range finding test*). Kisaran konsentrasi yang didapat selanjutnya digunakan untuk uji definitif untuk menentukan  $LC_{50}$  dari pestisida berbahan aktif metomil terhadap ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sebagai ikan uji.

#### 5.1.1 Uji Penentuan Kisaran (*range finding test*)

Uji ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ambang batas atas (N) dan konsentrasi ambang batas bawah (n) dari pestisida berbahan aktif metomil terhadap hewan uji ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Tahap ini dilakukan selama 96 jam dengan melihat tingkat mortalitas ikan nila uji. Konsentrasi yang dipakai dalam pengujian toksisitas menggunakan konsentrasi berdasarkan (Guthrie and Perry, 1980).

Berdasarkan uji toksisitas pendahuluan, tingkat mortalitas ikan pada konsentrasi percobaan dapat dilihat pada grafik :



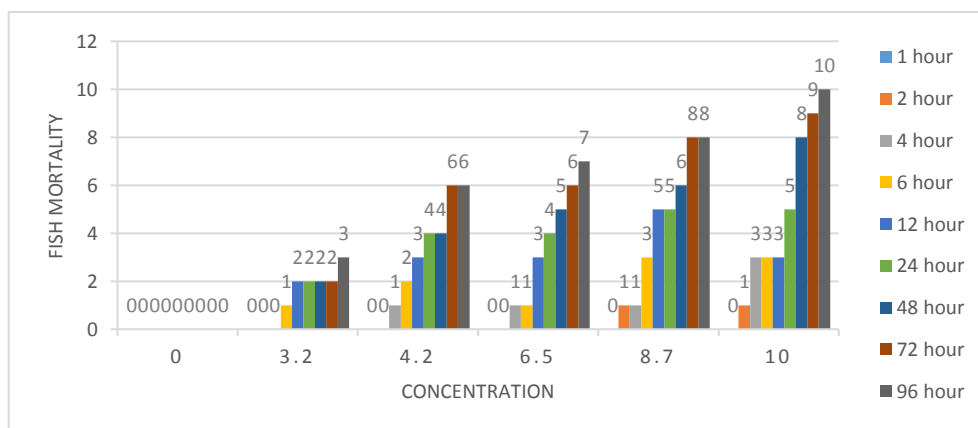
**Gambar 6** grafik mortalitas ikan selama uji penentuan kisaran

Hasil pengamatan pada uji penentuan kisaran ambang atas dan ambang bawah konsentrasi metomil terhadap ikan nila selama 96 jam menunjukkan mortalitas 100% terjadi pada konsentrasi perlakuan  $\geq 10$  ppm, pada konsentrasi 1 ppm hewan uji mengalami mortalitas 20%, sedangkan pada konsentrasi  $\leq 0,1$  ppm tidak terjadi mortalitas pada ikan nila uji. Berdasarkan data tersebut, konsentrasi 0,1 ppm digunakan sebagai kisaran ambang bawah konsentrasi metomil dan konsentrasi 10 ppm digunakan sebagai kisaran ambang atas.

Kisaran ambang atas dan ambang bawah selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas sesungguhnya dalam menentukan konsentrasi yang mampu mematikan 50% populasi ikan uji ( $LC_{50}$ ) dari pestisida berbahan aktif metomil. Berdasarkan kisaran tersebut, ditentukan variasi konsentrasi progresif pestisida metomil untuk uji definitif (penentuan  $LC_{50}$ ).

### 5.1.2 Uji Definitif ( $LC_{50}$ )

Uji definitif dilakukan untuk menentukan konsentrasi pestisida berbahan aktif metomil yang mampu menyebabkan mortalitas 50% dari ikan nila uji ( $LC_{50}$ ). Dari kisaran ambang atas dan ambang bawah konsentrasi metomil terhadap ikan nila yang didapat melalui uji penentuan kisaran selanjutnya ditentukan variasi konsentrasi untuk uji definitif berdasarkan skala logaritmik modifikasi dari Bowman dan Rand, (1980) yaitu 0 ppm; 3,2 ppm; 4,2 ppm; 6,5 ppm; 8,7 ppm dan 10 ppm.



Gambar 7. grafik mortalitas ikan selama uji definitif

Hasil dari uji definitif pada gambar 7 menjelaskan bahwa pada perlakuan pemaparan pestisida metomil dengan konsentrasi 0 ppm tidak terjadi mortalitas baik pada jam ke-0 hingga pada jam ke-96. Pada konsentrasi 3,2 ppm diketahui mortalitas mulai terjadi setelah pemaparan selama 6 jam sebanyak 1 ekor dan total kematian ikan selama pemaparan 96 jam adalah 3 ekor. Pada konsentrasi 4,2 ppm diketahui kematian ikan mulai terjadi setelah pemaparan selama 4 jam sebanyak 1 ekor dan total kematian selama pemaparan 96 jam adalah 6 ekor. Pada konsentrasi 6,5 ppm diketahui kematian ikan mulai terjadi setelah pemaparan selama 4 jam sebanyak 1 ekor dan total kematian selama pemaparan 96 jam adalah 7 ekor. Pada konsentrasi 8,7 ppm diketahui kematian ikan mulai terjadi setelah pemaparan selama 2 jam sebanyak 1 ekor dan total kematian selama pemaparan 96 jam adalah 8 ekor. Pada konsentrasi 10 ppm diketahui kematian ikan mulai terjadi setelah pemaparan selama 2 jam sebanyak 1 ekor dan total kematian selama pemaparan 96 jam adalah 10 ekor.

Selama waktu pemaparan 96 jam, kematian tertendah terjadi pada dosis 3.2 ppm (3 ekor) dan kematian tertinggi terjadi pada dosis 10 ppm (10 ekor). Sedangkan pada masing masing dosis (3,2; 4,2; 6,5; 8,7; dan 10 ppm), kematian terendah terjadi pada awal pemaparan (1 jam pemaparan) dan kematian tertinggi terjadi pada akhir masa pemaparan (96 jam pemaparan). Hal tersebut menunjukkan bahwa toksisitas pestisida berbahan aktif metomil terhadap ikan nila semakin tinggi dengan bertambahnya dosis dan waktu pemaparan. Menurut Connell *et al* (2016), suatu zat kimia akan semakin tinggi tingkat toksisitasnya terhadap organisme seiring meningkatnya dosis dan waktu pemaparan.

Berdasarkan analisis probit, diperoleh nilai  $LC_{50}$  96 jam dari pestisida berbahan aktif metomil terhadap ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berada pada konsentrasi 3,06 ppm. Nilai  $LC_{50}$  ini selanjutnya digunakan sebagai konsentrasi uji dalam menentukan pengaruh dari ekstrak flavonoid rumput laut coklat

(*Sargassum* sp.) terhadap parameter hematologi, mikronuklei dan histologi pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

## 5.2 Ekstraksi Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.)

Rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) setengah kering yang didapat dari petani sebanyak masing masing 1000 gram (berat kotor) dilakukan pencucian menggunakan air tawar. Proses pencucian juga dilakukan pemisahan dari komponen lain seperti batu kecil, lumpur, alga jenis lain dan lain sebagainya. Kemudian dilakukan proses pengeringan dengan metode *dry shade*. Setelah 2x24 jam didapat berat kering sebagai berikut :

**Tabel 7. Berat Kering Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.)**

Ulangan	Berat kering (Gram)
1	810
2	740
3	790
<b>Rata-Rata</b>	<b>780</b>

Berdasarkan hasil di atas, dari 1000 gram (berat kotor) rumput laut setengah kering, setelah dilakukan pencucian dan sortasi dari tanaman lain, batu, lumpur dan lain lain, didapat rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dengan berat kering (berat bersih) pada ulangan 1 adalah 810 gram, pada ulangan 2 adalah 740 gram dan pada ulangan 3 adalah 790 gram. Rata rata berat kering (berat bersih) yang didapat dari 1000 gram *sargassum* adalah 780 gram. Menurut Harborne (1987), pencucian ini dilakukan agar rumput laut yang akan diektrak adalah rumput laut yang kualitasnya bagus yaitu tidak berpenyakit, tidak terjangkit virus, bakteri, jamur sehingga nantinya didapat ekstrak rumput laut yang tidak tercemar dan membentuk hasil yang diharapkan.

Rumput laut kering kemudian dilakukan penggilingan dan proses ekstraksi. Ekstraksi rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dilakukan dengan menggunakan metode modifikasi dari Corpuz *et al* (2012). Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan masa perendaman selama 24 jam. Sedangkan pelarut yang digunakan adalah methanol (polar) dengan perbandingan pelarut dan bahan *sargassum* kering adalah 100gr : 500ml (1:5 b/v). Simplisia yang didapat selanjutnya dievaporasi menggunakan *RV 10 digital rotary evaporator* (suhu 50°C dan kecepatan 80 rpm) hingga dihasilkan ekstrak kasar berupa pasta.



**Gambar 8 Ekstrak *Sargassum* sp.;** (a) Ekstrak methanol; (b). ekstrak methanol pekat

Ekstrak methanol dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) yang dihasilkan berwarna hijau pekat (gambar 6a). Setelah dilakukan proses evaporasi dihasilkan ekstrak methanol pekat (gambar 6b). Perhitungan rendemen (lampiran) didapat berat rendemen sebagai berikut :

**Tabel 8. Rendemen ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.)**

Ulangan	Berat Estrak (Gram)	Konversi dalam bentuk %
1	8,83	9%
2	7,22	7,22 %
3	8,09	8,09 %



Nilai rendemen yang didapat pada ulangan 1 sebesar 8,83 gram (9%), pada ulangan 2 sebesar 7,22 gram (7,22%), pada ulangan 3 sebesar 8,09 gram (8,09%). Warna dari ekstrak methanol pekat tidak berbeda dengan ekstrak methanol. Warna hijau pekat ini merupakan kombinasi dari berbagai pigmen dan berbagai senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.). Menurut Ridwan *et al* (2017), Ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp) mengandung pigmen Pheophtin yang merupakan pigmen klorofil yang memberikan warna hijau pada rumput laut coklat (*Sargassum* sp.). Dalam studi yang dilakukan oleh Tanaka *et al* (2008), pigmen yang banyak terkandung dalam tumbuhan hijau selain klorofil adalah sejumlah besar golongan pigmen flavonoid.

### 5.3 Uji Fitokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.)

Uji fitokimia ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dilakukan dengan menggunakan metode Harborne (1996) yang meliputi alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, terpenoid dan saponin. hasil Analisa uji fitokimia ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp) dapat dilihat pada tabel dibawah

**Table 9 Analisa uji fitokimia ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp)**

Uji fitokimia	hasil	Standar (warna)
Flavonoid	+	Perubahan warna larutan menjadi merah/merah muda
Tannin	+	Perubahan hijau menjadi kehitaman
Alkaloid		
- Pereaksi meyer	-	Terbentk endapan berwarna kuning
- Pereaksi dragendrof	-	Terbentuk endapan berwarna jingga
Saponin	-	Terbentuk busa
Terpenoid	+	Perubahan warna menjadi kecoklatan
Steroid	+	Perubahan warna larutan menjadi hijau/biru

Keterangan : (+) Mengandung; (-) Tidak Mengandung

Uji fitokimia pada tanaman merupakan hal yang penting untuk dilakukan. Menurut Batra dan Sharma, (2012), hal ini bertujuan untuk menentukan total komponen fenolik secara tepat pada berbagai tumbuhan seperti pada rumput laut

coklat (*Sargassum* sp.). Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak metanol pekat rumput laut coklat (*Sargassum* sp) positif mengandung senyawa seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid saponin namun negative mengandung alkaloid. Menurut emrizal *et al*, (2014), Senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang artinya senyawa ini memiliki komponen fenolik. Hagerman (2002) menambahkan bahwa flavonoid mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin bezena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon.

Menurut Tanaka *et al* (2008) kandungan flavonoid dalam tanaman terbentuk di dalam sitosol dan terpusat dalam vakuola. Pada tanaman sendiri, Das (1994) mengemukakan bahwa flavonoid berperan dalam reaksi terang selama proses fotosintesis dimana senyawa ini mengkatalisasi transport electron. Aktivitas biologis yang kuat dari flavonoid menurut Nakamura *et. al* (2010) membuat senyawa ini dapat dijadikan sebagai antibakteri, antivirus, anti inflamasi, anti alergi, antioksidan and memiliki aktifitas vasodilatori.

#### 5.4 Kadar Total Senyawa Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.).

Ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) selanjutnya dilakukan uji kadar total senyawa flavonoid. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kadar total senyawa flavonoid dalam ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum* sp.). Kadar flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dengan metode  $AlCl_3$  pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 9 dibawah

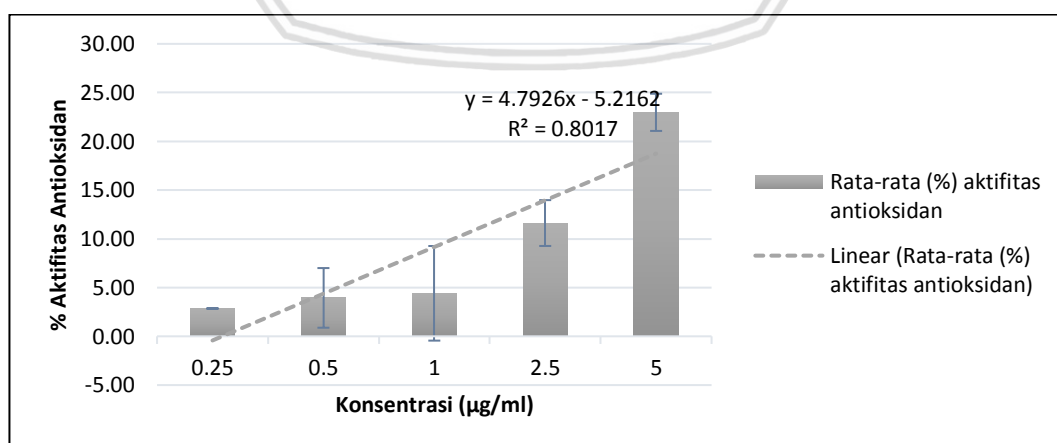
**Table 10 Kadar flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dengan metode  $AlCl_3$**

Ulangan	Absorbansi	Total Flavonoid (mg/L)	Volume Sampel (L)	Bobot Simplisia (Gram)	Faktor Pengenceran	Flavonoid Total (mg QE/L)
1	0.257	34.016	0.01	0.05	2.0	6.8032
2	0.281	37.856	0.01	0.05	2.0	7.5712
3	0.276	37.056	0.01	0.05	2.0	7.4112
Rata-Rata	0.271	36.309	0.01	0.05	2.0	7.2619

Hasil penelitian penentuan kadar flavonoid total pada rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) pada tabel 9 menunjukkan ekstrak simplisia rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) mengandung senyawa flavonoid total dengan rata rata senilai 36.309 mg/l (7.2619 mg QE/L). menurut Chaouche *et al* (2014) kadar total flavonoid yang terkandung dalam rumput laut coklat (*Sargassum oleifolium*) dengan metode yang sama adalah 7.15 mg QE/L. Kadar total flavonoid pada penelitian ini lebih tinggi dari literatur. Hal ini diduga karena adanya perbedaan spesies rumput laut yang dianalisa.

### 5.5 Uji Aktifitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dari flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) ini dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorban DPPH dengan absorban sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Aktivitas antioksidan flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dapat dilihat pada gambar 9 di bawah.



Gambar 9 Aktivitas antioksidan rumput laut coklat (*Sargassum* sp.)

Berdasarkan gambar 9 di atas, dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi flavonoid yang diberikan, maka semakin kuat aktifitas antioksidannya. Menurut Majewska *et al* (2011), semakin tinggi presentase flavonoid dalam suatu bahan, maka akan semakin kuat aktifitas antioksidannya. Berdasarkan persamaan linier yang didapat dari grafik uji aktifitas antioksidan rumput laut coklat (*Sargassum* sp.), didapat nilai  $IC_{50}$  sebesar 8,67 ( $\mu\text{g/ml}$ ).

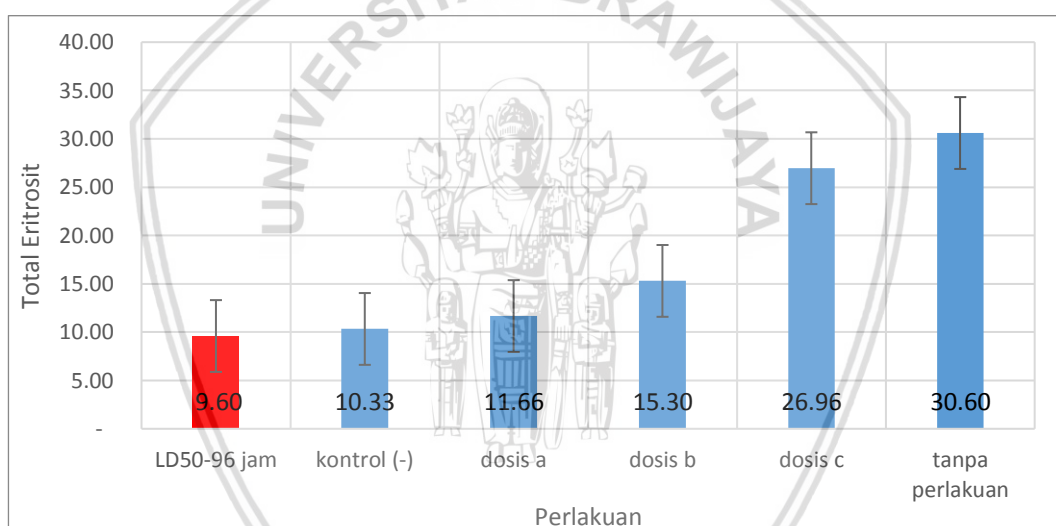
## 5.6 Parameter Hematologi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Parameter darah merupakan suatu indikator adanya perubahan kondisi kesehatan ikan, baik karena faktor infeksi (mikroorganisme) maupun karena faktor non infeksi oleh lingkungan, genetik dan nutrisi. Parameter darah yang diamati pada penelitian ini antara lain adalah eritrosit yang berperan dalam transport oksigen dan nutrisi dalam tubuh ikan (Roberts 1978); hemoglobin sebagai transport oksigen (Lagler *et al.* 1977); Hematokrit yang merupakan perbandingan sel darah merah dan plasma darah (Wells *et al.* 2005); dan Leukosit berperan dalam sistem kekebalan tubuh untuk mempertahankan tubuh terhadap penyakit dan material asing yang masuk dalam tubuh (Gupta *et al.* 2013).

### 5.6.1 Eritrosit

Setelah ikan nila dipapar pestisida berbahan aktif metomil dengan dosis  $LC_{50}$  selama 96 jam, didapat nilai eritrosit adalah  $9.60 \times 10^5 \pm 0.05$  sel/ml dan pada ikan nila tanpa perlakuan pestisida dan pemberian flavonoid adalah  $30.60 \times 10^5 \pm 1.53$  sel/ml. penurunan jumlah eritrosit ini dapat disebabkan karena adanya radikal bebas yang diakibatkan oleh paparan bahan toksik seperti pestisida metomil. Radikal bebas dalam tubuh ikan nila kemungkinan menyerang sel eritrosit sehingga menyebabkan ketidak seimbangan antara jumlah sel yang terdapat dalam sirkulasi darah dengan jumlah sel eritrosit yang disintesis pada sumsum tulang. Menurut Wijaya (1976) suatu bahan yang bersifat toksik mampu

menyebabkan berbagai kerusakan pada jaringan yang nantinya akan menimbulkan pelepasan protein heme dimana protein ini akan bereaksi dengan peroksidase dan melepaskan ion  $\text{Fe}^{++}$ . Yosmaniar (2009) menambahkan bahwa dengan adanya ion tersebut akan terjadi reaksi fenton dan menghasilkan radikal bebas (OH) dimana sifat radikal bebas ini sangat reaktif mengambil ion-ion di sekitarnya yang pada akhirnya dapat berakibat rusaknya membran sel yang parah dan membahayakan kehidupan sel. Bastami et al (2009) menambahkan, penurunan total eritrosit dalam tubuh akan mengakibatkan berkurangnya suplai nutrisi ke dalam sel, jaringan dan organ akan sehingga proses metabolisme dalam tubuh akan terhambat.



**Gambar 10. Grafik kadar eritrosit pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*)**

Ikan yang telah terpapar oleh pestisida berbahan aktif metomil dosis LC50 selama 96 jam kemudian dipindahkan kedalam aquarium yang berisi air baru tanpa pemberian pestisida. Ikan lalu diinjeksi dengan flavonoid. Setelah masa pemeliharaan 96 jam, nilai rata rata eritrosit pada perlakuan dosis kontrol (-) adalah  $10.33 \times 10^5 \pm 0.55$  sel/ml, pada perlakuan dosis b adalah  $11.66 \times 10^5 \pm 0.20$  sel/ml, pada perlakuan dosis b adalah  $15.30 \times 10^5 \pm 1.58$  sel/ml, dan pada perlakuan dosis c adalah  $26.96 \times 10^5 \pm 1.75$  sel/ml.

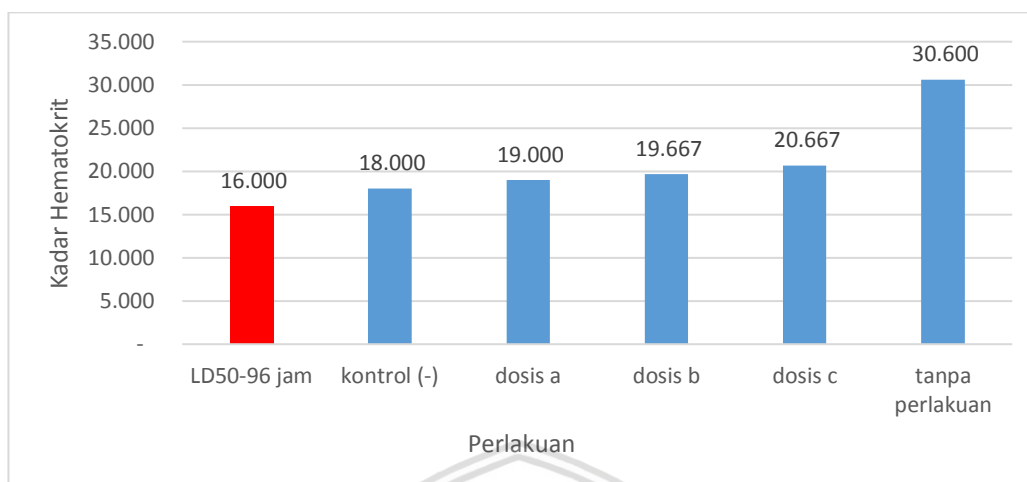


Hasil analisis statistik pada lampiran menunjukkan bahwa pengaruh lanjut pemberian flavonoid mampu secara nyata meningkatkan kadar eritrosit pada darah ikan nila uji seiring dengan meningkatnya dosis pemberian ( $p < 0.05$ ). Menurut Sundaryono (2011) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan yang di dalam sel darah dapat bertindak sebagai penampung radikal bebas dan superoksida sehingga melindungi lipid membrane sel, mencegah kerusakan sel darah dan mampu meningkatkan eritropoiesis (proses pembentukan eritrosit) dalam sumsum tulang.

### 5.6.2 Hematokrit

Pada ikan nila tanpa perlakuan didapat kadar hematokrit pada darah adalah  $30.6\% \pm 1.53$ . Setelah ikan dipapar pestisida berbahan aktif metomil dengan dosis LC50 selama 96 jam, didapat nilai hematokrit adalah  $16\% \pm 1.00$ . penelitian yang dilakukan Wells *et al* (2005) menjelaskan bahwa hematokrit merupakan perbandingan antara sel darah merah dan plasma darah. Pada penelitian ini, ikan uji mengalami penurunan kadar hematokrit setelah 96 jam dipapar oleh pestisida berbahan aktif metomil dengan dosis LC50.

Penurunan kadar hematokrit pada ikan hingga dibawah kisaran normal dapat mengindikasikan bahwa ikan yang tepapar pestisida metomil mengalami defisiensi eritrosit sekaligus menunjukkan bahwa ikan sedang mengalami anemia. Menurut penelitian Bond (1979), nilai hematokrit ikan teleostei yang normal berkisar antara 20 – 30%. Nabib dan Pasaribu (1989) menjelaskan bahwa ikan yang memiliki nilai hematokrit dibawah 30% menunjukkan bahwa ikan tersebut mengalami defisiensi eritrosit. Sedangkan Galaugher *et al* (1995) menyatakan bahwa nilai hematokrit yang lebih kecil dari 22% menunjukkan ikan mengalami anemia.



**Gambar 11. Grafik kadar hematokrit pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*)**

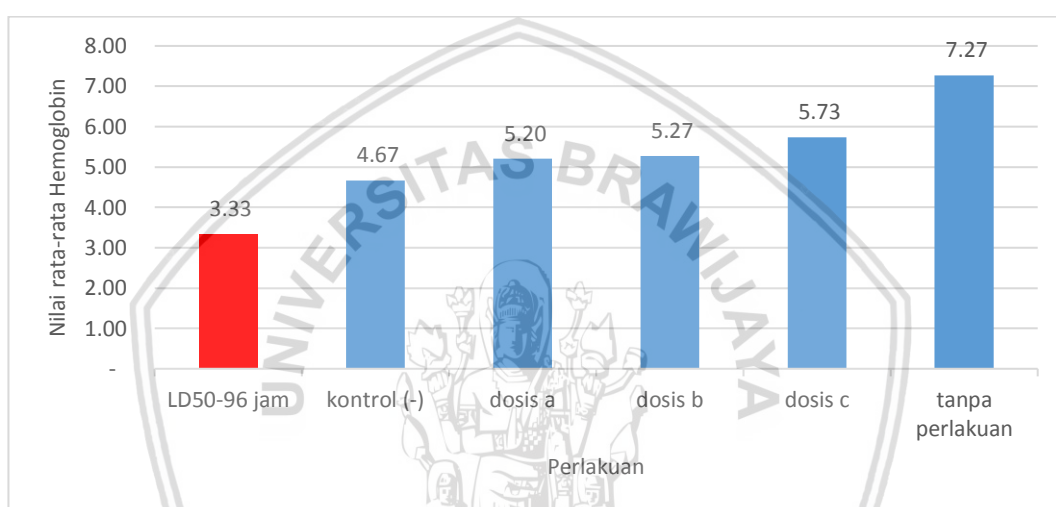
Ikan yang telah terpapar oleh pestisida berbahan aktif metomil dosis LC50 selama 96 jam kemudian dipindahkan kedalam aquarium yang berisi air baru tanpa pemberian pestisida. Ikan lalu diinjeksi dengan flavonoid. Setelah masa pemeliharaan 96 jam, nilai rata rata hemaokrit pada perlakuan dosis control (-) adalah  $18\% \pm 1.00$ , pada perlakuan dosis b adalah  $19\% \pm 1.00$ , pada perlakuan dosis b adalah  $19.667\% \pm 1.52$ , pada perlakuan dosis c adalah  $20.667\% \pm 1.52$ ,

Hasil analisis statistik pada lampiran menunjukkan bahwa pengaruh lanjut pemberian flavonoid pada dosis yang lebih tinggi secara nyata dapat meningkatkan kadar hematokrit pada ikan Nila ( $p < 0.05$ ). hal ini sesuai dengan penelitian Unigwe dan Nwakpu (2009), pemberian makanan yang mengandung bahan aktif flavonoid dapat meningkatkan kadar hematokrit dalam darah.

### 5.6.3 Hemoglobin

Pada ikan nila tanpa perlakuan perstisida aktif metomil, kadar hemoglobin pada darah ikan adalah  $7.27 \pm 0.15$  hb/100ml. Setelah ikan dipapar pestisida berbahan aktif metomil dengan dosis LC50 selama 96 jam, didapat nilai hematokrit adalah  $3.33 \pm 0.63$  hb/100ml. Menurut Pamila et al. (1991), menurunnya kadar

hemoglobin pada ikan yang terpapar suatu zat beracun juga dapat disebabkan oleh sifat penghambatan zat beracun tersebut pada sistem enzim yang bertanggung jawab dalam mensintesis hemoglobin dalam tubuh ikan. Wepener et al. 1992), menambahkan bahwa terjadinya penurunan kadar hemoglobin pada darah dapat menjadi indikator menurunnya kemampuan ikan untuk menyediakan oksigen yang cukup bagi jaringan tubuh sehingga menghasilkan penurunan aktivitas fisik ikan.



**Gambar 12. Grafik kadar hemoglobin pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*)**

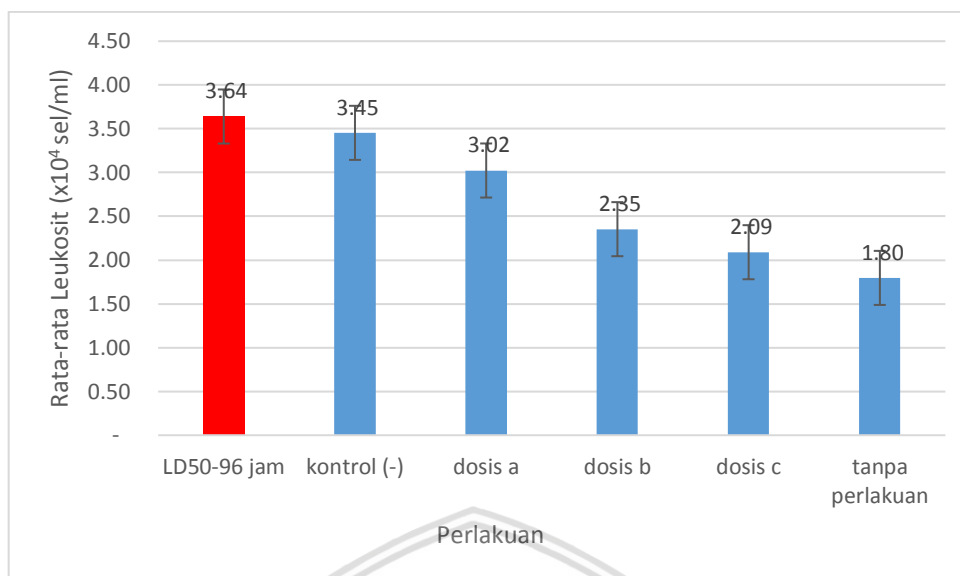
Ikan yang telah terpapar oleh pestisida berbahan aktif metomil dosis LC50 selama 96 jam kemudian dipindahkan kedalam aquarium yang berisi air baru tanpa pemberian pestisida. Ikan lalu diinjeksi dengan flavonoid. Setelah masa pemeliharaan 96 jam, nilai rata rata hemoglobin pada perlakuan dosis control (-) adalah  $4.67 \pm 1.63$  hb/100ml, pada perlakuan dosis b adalah  $5.20 \pm 0.20$  hb/100ml, pada perlakuan dosis b adalah  $5.27 \pm 0.11$  hb/100ml, pada perlakuan dosis c adalah  $5.73 \pm 0.64$  hb/100ml.

Hasil analisis statistik pada lampiran menunjukkan bahwa pengaruh lanjut pemberian flavonoid pada dosis yang lebih tinggi secara nyata dapat meningkatkan kadar hemoglobin pada ikan Nila ( $p < 0.05$ ). Menurut penelitian yang

dilakukan oleh Kitagawa (2004), Interaksi antara flavonoid dengan hemoglobin menghambat reaksi kerusakan enzimatis dalam eritrosit, sehingga tidak terjadi kerusakan membran eritrosit (hemolisis). Meningkatnya kadar eritrosit pada darah ikan yang diberi perlakuan pemberian flavonoid akan berbanding lurus dengan peningkatan kadar hemoglobin pada darah ikan. Menurut Asri *et al* (2015), Hemoglobin merupakan bagian dari eritrosit yang berfungsi dalam mengikat oksigen untuk diedarkan ke seluruh tubuh, maka peningkatan jumlah eritrosit akan berbanding lurus dengan peningkatan kadar hemoglobin. Soeharsono (2010) menambahkan bahwa setiap eritrosit mengandung  $\pm 180$  juta molekul hemoglobin.

#### 5.6.4 Leukosit

Pada ikan nila tanpa perlakuan perstisida didapat kadar leukosit pada darah ikan adalah  $1.80 \times 10^4 \pm 0.54$  sel/ml. Setelah ikan dipapar pestisida berbahan aktif metomil dengan dosis LC50 selama 96 jam, didapat nilai leukosit adalah  $3.64 \times 10^4 \pm 0.15$  sel/ml. Menurut Lukmini (2016), Kenaikan leukosit juga mengindikasikan terjadinya kerusakan pada jaringan tubuh, stres fisik yang parah, dan leukositosis. Penelitian lain yang telah dilakukan oleh El-sayed *et al* (2007) menjelaskan bahwa paparan pestisida merupakan salah satu stressor lingkungan yang dapat menstimulasi limfopoiesis dan meningkatkan pelepasan limfosit pada jaringan limfomyeloid dalam tubuh ikan nila sehingga adanya paparan pestisida metomil ini akan menyebabkan peningkatan jumlah leukosit (leukositosis) pada darah ikan nila. Pada penelitian ini, meningkatnya jumlah leukosit pada ikan nila yang terpapar pestisida metomil merupakan salah satu bentuk pertahanan diri terhadap masuknya bahan asing yaitu pestisida berbahan aktif metomil dalam tubuh ikan nila. Hal ini dijelaskan oleh Murray *et al* (1996) dalam penelitiannya dimana leukosit merupakan sel darah yang berperan menjalankan fungsi sistem antibodi dalam tubuh ikan.



**Gambar 13. Grafik kadar leukosit pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*)**

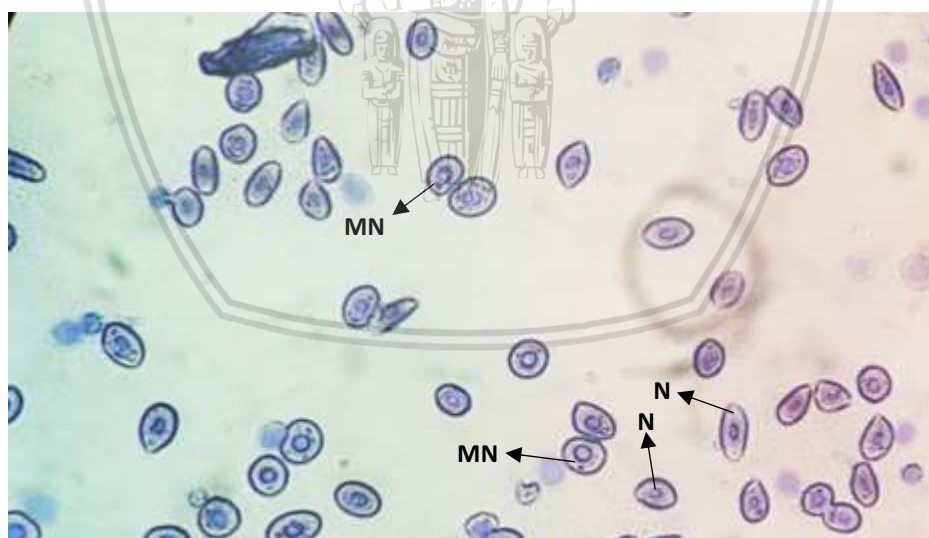
Ikan yang telah terpapar oleh pestisida berbahan aktif metomil dosis LC50 selama 96 jam kemudian dipindahkan kedalam aquarium yang berisi air baru tanpa pemberian pestisida. Ikan lalu diinjeksi dengan flavonoid. Setelah masa pemeliharaan 96 jam, nilai rata rata leukosit pada perlakuan dosis control (-) adalah  $3.45 \times 10^4 \pm 0.15$  sel/ml, pada perlakuan dosis b adalah  $3.02 \times 10^4 \pm 0.11$  sel/ml, pada perlakuan dosis b adalah  $2.35 \times 10^4 \pm 0.13$  sel/ml, dan pada perlakuan dosis c adalah  $2.09 \times 10^4 \pm 0.12$  sel/ml.

Hasil analisis statistik pada lampiran menunjukkan bahwa pengaruh lanjut pemberian flavonoid pada dosis yang lebih tinggi secara nyata dapat menurunkan kadar leukosit pada ikan Nila ( $p < 0.05$ ). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Kawakita et al (2005), flavonoid secara signifikan mampu berperan sebagai imunostimulan dengan merangsang proliferasi leukosit dengan cara meningkatkan aktivitas sel T helper, sitokin, interleukin-2, g-interferon, dan makrofag yang berguna dalam pengobatan beberapa penyakit. Hal ini membuktikan bahwa pemberian flavonoid dapat mempercepat proses penyembuhan ikan yang terpapar pestisida berbahan aktif metomil sehingga saat ikan kembali sehat, jumlah leukosit

juga akan kembali normal. Sundaryono (2011) dalam penelitiannya juga menegaskan bahwa pemberian bahan yang mengandung senyawa flavonoid mampu menurunkan jumlah leukosit pada darah.

### 5.7 Parameter Mikronuklei Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Pada ikan nila tanpa perlakuan pestisida didapat kadar leukosit pada darah ikan adalah  $75,6 \pm 8,38 \%$ . Setelah ikan dipapar pestisida berbahan aktif metomil dengan dosis LC50 selama 96 jam, didapat nilai leukosit adalah  $829,6 \pm 7,92 \%$ . Paparan pestisida pada ikan merupakan salah satu sebab meningkatnya frekwensi mikronuklei pada eritrosit ikan. Menurut studi yang telah dilakukan oleh Mitchelmore et al (1998) terhadap ikan nila (*Oreochromis mossambicus*), konsenrasi dan lama waktu pemaparan pestisida terhadap ikan mampu meningkatkan induksi mikronuklei pada eritrosit peripheral ikan. Gambaran mikronuklei dapat dilihat pada gambar 14 di bawah.

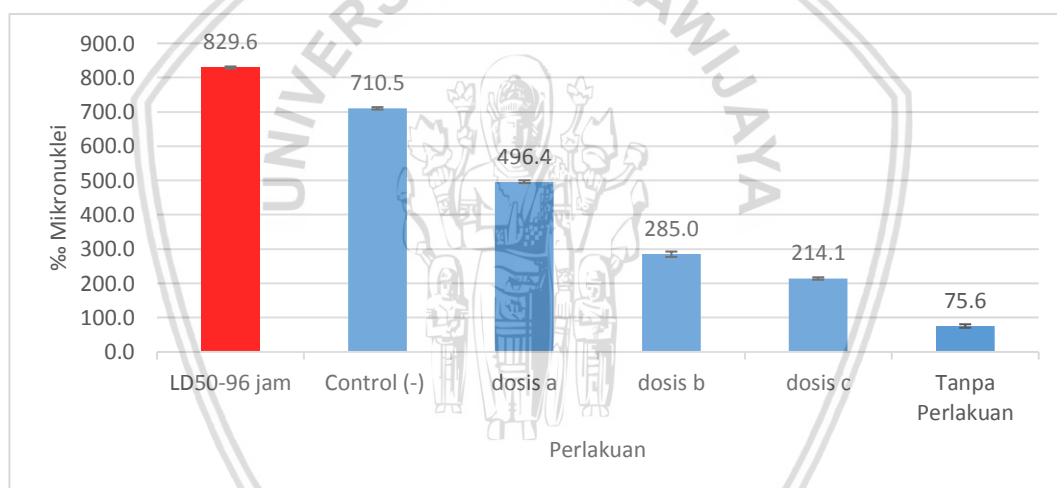


**Gambar 14. Sel perifer eritrosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*).  
MNI = sel darah yang memiliki mikronuklei; N = Sel eritrosit normal**

Menurut Purwadiwarsa (2000) senyawa karsinogenik seperti pestisida berbahan aktif metomil dapat mengganggu proses pembelahan sel dengan



menghambat pembentukan benang spindle sehingga mengakibatkan segregasi kromosom tidak sempurna. Menurut Nina (2008) Jika proses pembelahan sel ini terganggu karena kromosom rusak akibat bahan kimia atau radiasi, maka distribusi bahan genetik nukleus baru selama pembelahan sel akan terpengaruh dan sebagian atau mungkin seluruh kromosom akan gagal untuk dimasukkan dalam salah satu dari dua nukleus baru. Ketika ini terjadi, materi genetik yang tidak dimasukkan ke dalam inti akan membentuk sendiri nukleus yang berukuran lebih kecil dari nukleus utama yang terlihat jelas dengan mikroskop. Sumpena (2009) menambahkan, Aberasi kromosom akibat induksi oleh bahan kimia dapat memicu pembentukan mikronukleus.



**Gambar 15. Grafik frekwensi mikronuklei ikan nila (*Oreochromis niloticus*)**

Ikan yang telah terpapar oleh pestisida berbahan aktif metomil dosis LC50 selama 96 jam kemudian dipindahkan kedalam aquarium yang berisi air baru tanpa pemberian pestisida. Ikan lalu diinjeksi dengan flavonoid. Setelah masa pemeliharaan 96 jam, frekwensi mikronuklei pada perlakuan dosis control (-) adalah  $710,5 \pm 14,2$  ‰, pada perlakuan dosis a adalah  $496,4 \pm 18,4$  ‰, pada perlakuan dosis b adalah  $285,0 \pm 30,7$  ‰, dan pada perlakuan dosis c adalah  $214,1 \pm 10,45$  ‰.

Hasil analisis statistik pada lampiran menunjukkan bahwa pengaruh lanjut pemberian flavonoid pada dosis yang lebih tinggi secara nyata dapat menurunkan frekwensi mikronuklei pada eritrosit ikan Nila ( $p < 0.05$ ). Menurut Meiyanto *et al* (2012), hal ini terjadi karena flavonoid merupakan senyawa yang berpotensi sebagai agen *Co-Chemotherapeutic* dan mampu mereduksi sel yang diduga kanker dengan cara memodulasi siklus sel dan menginduksi aktifitas apoptosis sel sehingga mampu mematikan sel sel yang berpotensi kanker seperti sel mikronukei.

Selain itu, Miller (1996) menambahkan bahwa flavonoid juga dikenal sebagai senyawa yang mampu bertindak sebagai immunostimulan, antitumor, antiHIV dan antioksidan. Senyawa ini mampu melindungi sel sel tubuh ikan yang sehat dari paparan pestisida metomil dan membantu proses regenerasi sel darah merah. Peran senyawa flavonoid terhadap sel darah dijelaskan dalam penelitian Sudaryono (2011), dimana senyawa flavonoid mampu melindungi lipid membran sel, mencegah kerusakan sel darah dan mampu meningkatkan eritropoiesis yaitu proses pembentukan eritrosit dalam sumsum tulang. Oleh karena itu, pemberian flavonoid ini mampu menghancurkan sel sel yang berpotensi kanker dan membantu membentuk sel sel darah baru sehingga dapat memulihkan kembali kondisi darah ikan nila.

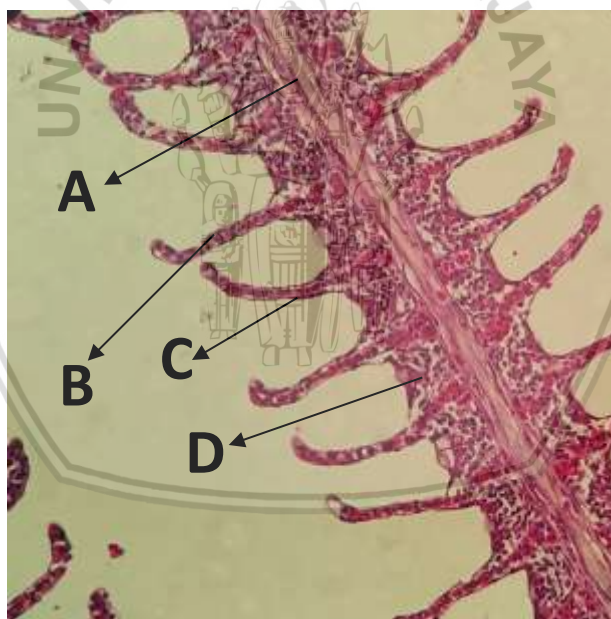
### **5.8 Parameter Histologi Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**

Insang merupakan organ penting bagi ikan nila. Dolenec & Kuzir (2009) menyatakan bahwa insang ikan adalah organ multifungsi yang bertanggung jawab untuk respirasi, osmoregulasi, keseimbangan asam-basa dan ekskresi limbah nitrogen. Menurut Wulandari *et al* (2013), Insang adalah salah satu organ ikan nila yang kondisinya sangat dipengaruhi oleh perubahan kualitas perairan karena setiap waktu kontak dengan lingkungan untuk pernafasan eksternalnya sehingga

sangat mungkin terjadi perubahan histologis akibat adanya pencemaran pada lingkungan perairan.

### 5.8.1 Histologi Insang Ikan Nila Tanpa Perlakuan

Analisis histologis pada insang ikan dapat menggambarkan tingkat kerusakan yang terjadi akibat adanya paparan bahan toksik di perairan. Pada penelitian ini dilakukan analisis histologi insang nila (*Oreochromis niloticus*) yang tidak diberi perlakuan paparan pestisida berbahan aktif metomil ataupun dosis flavonoid. Hasil yang didapat nantinya dijadikan sebagai bahan pembanding terhadap kondisi insang ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi perlakuan. Gambaran histologi insang nila (*Oreochromis niloticus*) yang tidak diberi perlakuan dapat dilihat pada gambar 15.



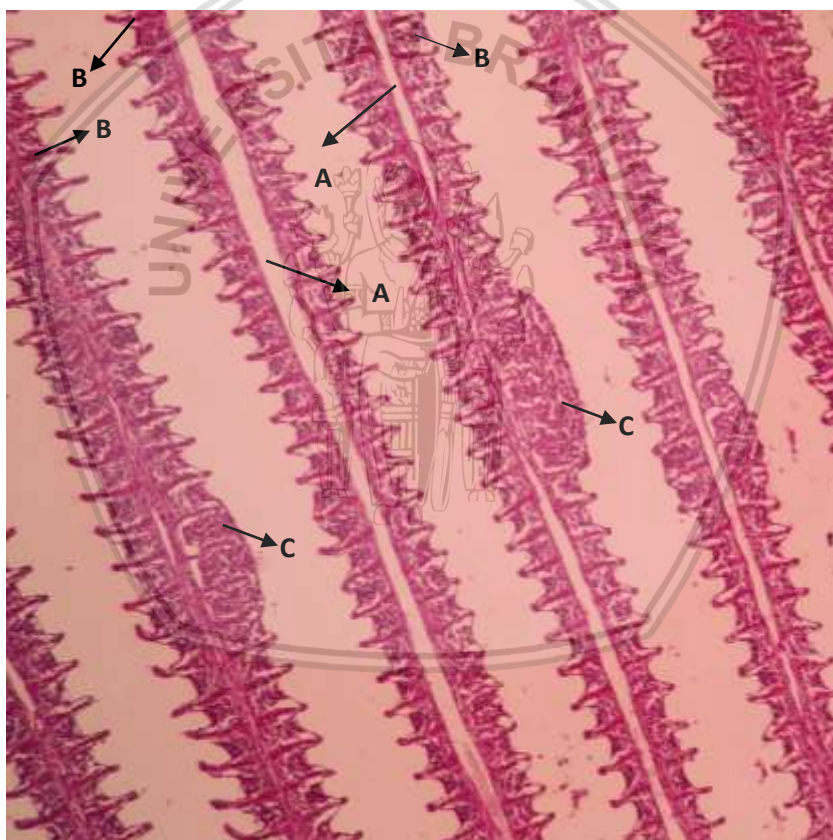
**Gambar 16** Gambaran histologi insang ikan Nila tanpa perlakuan; A = Lamella Primer; B = Lamella Sekunder; C = sel epitelium; D = Sel Basal.

Gambar 15 menjelaskan bahwa tidak ada perubahan pada struktur lamela primer dan lamella sekunder. Sel basal dan epitelium yang terlihat juga masih terlihat normal. Hal ini menandakan kondisi insang ikan masih dalam kondisi sehat. Menurut Barnett *et al.*, (1999), permukaan insang yang luas secara langsung dan

permanen selalu kontak dengan lingkungan perairan sehingga membuat organ ini menjadi marker utama adanya polutan di perairan.

### 5.8.2 Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Dengan Konsentrasi LC50 Selama 96 Jam.

Perlakuan selanjutnya adalah ikan nila dipapar dengan pestisida berbahan aktif metomil. Konsentrasi yang dipakai adalah konsentrasi LC50 selama 96 jam yang sebelumnya telah ditentukan pada penelitian pendahuluan. Hasil dari pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa terjadi perubahan pada jaringan insang ikan Nila (*O. niloticus*) seperti pada gambar 16.



**Gambar 17** gambaran histologi insang ikan nila yang terpapar pestisida berbahan aktif metomil dengan konsentrasi LC50 selama 96 jam; A = Edema; B = Vakuolasi; C = Fusi.

Berdasarkan gambar 15, menunjukkan bahwa paparan pestisida berbahan aktif metomil menyebabkan terjadinya beberapa perubahan pada struktur histologi insang yang meliputi Edema (A), Vakuloasi (B), dan Fusi (C). Dalam penelitian lain

yang dilakukan oleh Devi dan Mishra (2013) terhadap ikan gabus (*Channa punctatus*) juga membuktikan bahwa adanya paparan pestisida mampu menyebabkan perubahan struktur pada insang ikan. Menurut Suparjo (2010), kerusakan yang terjadi pada lamela insang ini dapat mengganggu proses pertukaran gas-gas respiratorik sehingga ikan akan mengalami kesulitan dalam melakukan pernapasan yang nantinya dapat berujung pada kematian ikan nila secara kronis.

### 5.8.3 Skoring Kerusakan Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Dengan Konsentrasi LC50 Selama 96 Jam.

Skoring dilakukan untuk mengetahui tingkat persentase kerusakan pada jaringan insang ikan nila akibat paparan pestisida berbahan aktif metomil. Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan. Pemberian skor dilakukan menurut Raza'l (2008) yaitu 1-4 dimana skor 1 untuk presentase kerusakan 0-5%, skor 2 untuk presentase kerusakan 6-25%, skor 3 untuk presentase kerusakan 26-50%, dan skor 4 untuk presentase kerusakan >50%. Hasil skoring kerusakan insang ikan nila akibat paparan pestisida metomil pada penelitian ini tersaji pada tabel 11

**Tabel 11. Rata-Rata Skoring Kerusakan Jaringan pada Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil**

Jenis Kerusakan Jaringan	Perlakuan	Rata-Rata	Skor Pembulatan
Edema	Dosis LC50	3.6	4
	Tanpa Perlakuan	1.2	1
Vakuolasi	Control (-)	3.6	4
	Tanpa Perlakuan	1.0	1
Fusi	Control (-)	3.0	3
	Tanpa Perlakuan	1.0	1



### **A Kerusakan Edema Pada Insang Ikan Nila**

Edema adalah meningkatnya volume cairan ekstraseluler dan ekstraseluler disertai dengan penimbunan cairan ini di dalam sela-sela jaringan dan rongga serosa (Saleh 1979). Masuknya air dan senyawa pestisida akan menyebabkan penimbunan cairan pada lamella insang. Menurut Laksman (2003), Edema yang berlebihan dapat menyebabkan hiperplasia akibat sel darah merah keluar dari kapilernya dan sel akan terlepas dari jaringan penyongkongnya.

Pada tabel 11, Hasil rata-rata skoring kerusakan edema pada insang ikan nila yang terpapar pestisida metomil adalah 4 dan pada ikan tanpa perlakuan adalah 1. Menurut Raza'l (2008), nilai skor 4 menandakan kerusakan insang ikan nila yang terpapar pestisida berbahaya aktif metomil terjadi lebih dari 50%. Ronald (1989) menjelaskan, edema dapat terjadi karena adanya paparan senyawa pestisida ke dalam sel atau jaringan intertisial mengakibatkan penimbunan cairan dalam sel sehingga terjadi edema, antara sel yang satu nampak terpisah dengan sel yang lainnya.

### **B Kerusakan Vakuolasi Pada Insang Ikan Nila**

Pada tabel 11, Hasil rata-rata skoring vakuolasi yang terjadi pada insang ikan nila yang terpapar pestisida metomil adalah 4 dan pada ikan tanpa perlakuan adalah 1. Menurut Raza'l (2008), nilai skor 4 menandakan kerusakan insang ikan nila yang terpapar pestisida berbahaya aktif metomil terjadi lebih dari 50%. Kerusakan yang tinggi ini terjadi karena insang merupakan organ yang langsung berhadapan dengan lingkungannya. Wulandari *et al* (2013) menyatakan, Insang merupakan organ respirasi ekskresi yang langsung berhubungan dengan lingkungan luar dan produk ekskresi sehingga dapat segera berdifusi.

Paparan pestisida dapat menyebabkan perubahan terbesar seperti vakuolisasi pada sel epitel dari ikan rainbow trout. Vakuolisasi juga dilaporkan



terjadi pada ginjal ikan mas yang terpapar pestisida hexachlorobutadiene (Fischer-Scherl et al. 1991; Reimschuessel et al. 1989). Insang ikan yang terpapar pestisida akhirnya terjadi kerusakan dan membuat ikan sulit untuk melakukan respirasi dan mengakibatkan sel sel insang mengalami kerusakan histologi berupa vakuolisasi. vakuolisasi merupakan hilangnya struktur normal sel sebelum kematian sel dimana hal ini merupakan tanda dimulainya kerusakan sel akibat zat toksik. Salah satu hal yang dapat menyebabkan terjadinya vakuolisasi adalah kekurangan oksigen pada sel (hipoksia) sehingga mengganggu proses metabolisme (Edleen, 2015). Kematian ikan nila (*Oreochromis niloticus*) secara cepat disebabkan oleh adanya hubungan langsung antara bahan toksik lingkungan dan jaringan insang dimana bahan toksik tersebut dapat mengakibatkan struktur jaringan insang yang terdiri epitel tipis menjadi rentan terhadap kerusakan.

### **C Kerusakan Fusi Pada Insang Ikan Nila**

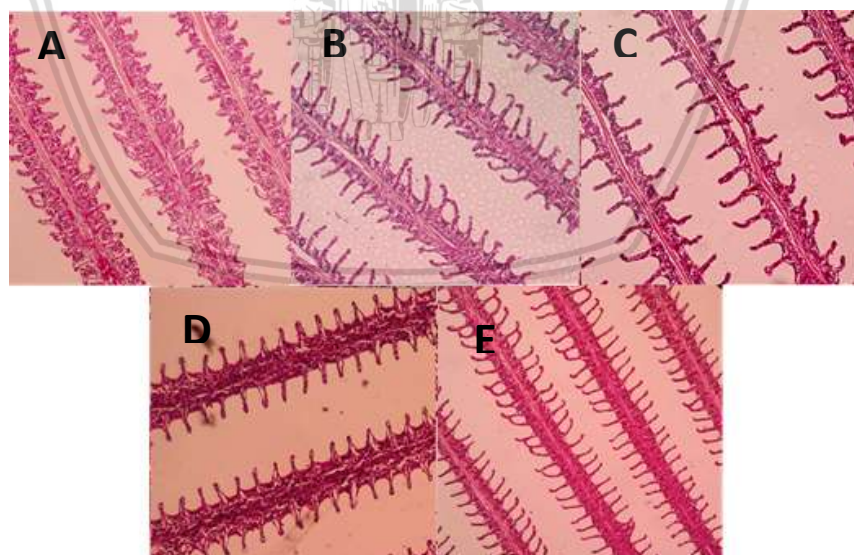
Menurut Camargo & Martinez, (2007), Fusi lamela merupakan hasil akhir dari hiperplasia lamela secara besar-besaran yang mengakibatkan berkurangnya luas permukaan insang. Fusi pada lamela sekunder merupakan reaksi akut akibat iritasi oleh bahan-bahan kimia salah satunya adalah pestisida berbahan aktif metomil. Pada tabel 11, Hasil rata-rata skoring kerusakan fusi pada insang ikan nila yang terpapar pestisida metomil adalah 3 dan pada ikan tanpa perlakuan adalah 1. Menurut Raza'l (2008), nilai skor 3 menandakan kerusakan insang ikan nila yang terpapar pestisida berbahan aktif metomil terjadi antara 26%-50%.

Terjadinya fusi pada insang ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) pada penelitian ini disebabkan oleh tingginya tingkat kerusakan berupa hyperplasia. Menurut Rodrigues (2017), poliferasi pada sel insang seperti hyperplasia dapat mengarah pada terjadinya fusi pada lamella insang. Selain itu, Modu et al., (2012) menyatakan, adanya sel epitel yang mengalami fusi pada lamela insang dapat

menyebabkan luas pada permukaan insang untuk berespirasi berkurang, gangguan aliran darah pada insang dan gangguan metabolisme tubuh sehingga mengakibatkan kematian ikan.

#### 5.8.4 Gambaran Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum sp.*).

Flavonoid dikenal mampu membantu dalam proses penyembuhan dan regenerasi sel sel tubuh yang rusak. Menurut Mawarti dan Ghofar (2014), Pemberian suplemen yang mengandung flavonoid tinggi (90%) pada ikan yang mengalami kerusakan histologi berupa (edema hyperplasia, dusi, nekrosis) dapat membantu proses Reepitelisasi pada sel epitel insang yang rusak. Pada penelitian ini, Ikan nila yang telah dipapar pestisida berbahan aktif metomil kemudian diinjeksi senyawa flavonoid rumput laut coklat (*Sargassum sp.*) dengan dosis berbeda berdasarkan dosis IC<sub>50</sub>. Gambaran histologinya dapat dilihat pada Gambar 17 dibawah :



**Gambar 18. Gambaran Histologi Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum sp.*). A = Tanpa Pemberian Flavonoid; B = Pemberian Flavonoid Dosis 1/3 IC<sub>50</sub>; C = Pemberian Flavonoid Dosis 2/3 IC<sub>50</sub>; D = Pemberian Flavonoid Dosis 3/3 IC<sub>50</sub>; E = Kontrol.**

Setelah 96 jam terpapar pestisida berbahan aktif metomil, ikan kemudian dipindahkan kedalam aquarium pemeliharaan yang berisi air bersih dan diberikan perlakuan. Setelah 48 jam, insang ikan pada gambar A (tanpa pemberian flavonoid) masih terjadi kerusakan insang yang tinggi meliputi edema, vakuolisasi, dan fusi. Pada gambar B (Pemberian Flavonoid Dosis 1/3 IC<sub>50</sub>) kerusakan insang terlihat berkurang meskipun masih terlihat beberapa kerusakan. Pada gambar C (Pemberian Flavonoid Dosis 2/3 IC<sub>50</sub>) kerusakan insang semakin menurun namun lamella sekunder masih belum sepenuhnya kembali normal. Pada gambar D (Pemberian Flavonoid Dosis 3/3 IC<sub>50</sub>) kerusakan insang juga masih terlihat namun lamella sekunder terlihat berangsur-angsur kembali normal.

#### **5.8.5 Skoring Kerusakan Pada Insang Ikan Nila Yang Terpapar Pestisida Berbahan Aktif Metomil Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum sp.*).**

Skoring dilakukan untuk mengetahui pengaruh yang ditimbulkan oleh flavonoid terhadap tingkat persentase pengurangan kerusakan pada jaringan insang ikan nila akibat paparan pestisida berbahan aktif metomil. Persentase kerusakan pada setiap luas bidang lapang pandang yang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan. Preparat histopatologis ikan nila dilakukan dengan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE), kemudian diamati gambaran histopatologisnya di 5 lapangan pandang secara acak dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x. Gambaran histopatologis hati tikus wistar dinilai dengan menghitung tingkat kerusakan hepatosit berdasarkan skor derajat perubahan struktur histopatologis jaringan insang. Skoring dilakukan menurut Raza'l (2008) yaitu 1-4 dimana skor 1 untuk kerusakan 0-5%, skor 2 untuk kerusakan 6-25%, skor 3 untuk kerusakan 26-50%, dan skor 4 untuk kerusakan >50%. Hasil skoring dapat dilihat pada tabel 12

**Tabel 12 Rata-Rata Skoring Tingkat Kerusakan Jaringan pada Insang Setelah Diberi Flavonoid Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.); A = Tanpa Pemberian Flavonoid; B = Pemberian Flavonoid Dosis 1/3 IC50; C = Pemberian Flavonoid Dosis 2/3 IC50; D = Pemberian Flavonoid Dosis 3/3 IC50; E = Kontrol**

Jenis Kerusakan Jaringan	Perlakuan	Rata Rata Skoring
<b>Edema</b>	A	3.6
	B	2.4
	C	2.4
	D	1.8
	E	1.2
<b>Vakuolisasi</b>	A	3.6
	B	2.8
	C	2.2
	D	1.8
	E	1.0
<b>Fusi</b>	A	3.0
	B	2.0
	C	1.6
	D	1.4
	E	1.0

Dari tabel 12, kerusakan edema insang ikan pada perlakuan A memiliki skor 3,6 yang artinya insang mengalami edema yang tergolong tinggi. Pada perlakuan B dan C memiliki skor 2.4 artinya insang mengalami edema yang tergolong sedang. Pada perlakuan D memiliki skor terendah yaitu 1.8. Ini membuktikan bahwa pemberian flavonoid dapat menurunkan edema yang terjadi pada insang ikan nila akibat paparan pestisida berbahan aktif metomil.

Berdasarkan tabel 12, Skoring kerusakan vakuolisasi insang ikan nila pada perlakuan A memiliki skor 3,6 yang artinya insang mengalami vakuolisasi yang tergolong sangat berat. Pada perlakuan B memiliki skor 2.8 artinya insang mengalami vakuolisasi yang tergolong berat. Pada perlakuan C memiliki skor 2.2 artinya insang mengalami hiperplasia yang tergolong sedang. Pada perlakuan D memiliki skor terendah yaitu 1.8. ini membuktikan bahwa pemberian flavonoid

dapat menurunkan vakuolisasi yang terjadi pada insang ikan nila akibat paparan pestisida berbahan aktif metomil.

Skoring kerusakan fusi insang ikan nila menurut tabel 12 pada perlakuan A memiliki skor 3,0 yang artinya insang mengalami fusi yang tergolong berat. Pada perlakuan B memiliki skor 2.0 artinya insang mengalami fusi yang tergolong sedang. Pada perlakuan C memiliki skor 1.6 artinya insang mengalami fusi yang tergolong sedang. Pada perlakuan D memiliki skor terendah yaitu 1.4. ini membuktikan bahwa pemberian flavonoid dapat menurunkan fusi yang terjadi pada insang ikan nila akibat paparan pestisida berbahan aktif metomil.

Skoring kerusakan nekrosis insang ikan nila menurut tabel 12 pada perlakuan A memiliki skor 3,2 yang artinya insang mengalami nekrosis yang tergolong berat. Pada perlakuan B memiliki skor 3,2 artinya insang mengalami nekrosis yang tergolong berat. Pada perlakuan C memiliki skor 2.6 artinya insang mengalami nekrosis yang tergolong sedang. Pada perlakuan D memiliki skor terendah yaitu 2. ini membuktikan bahwa pemberian flavonoid dapat menurunkan nekrosis yang terjadi pada insang ikan nila akibat paparan pestisida berbahan aktif metomil.

Berdasarkan data pada tabel 12 , pemberian flavonoid dengan konsentrasi yang semakin tinggi terbukti mampu mempercepat penurunan tingkat kerusakan insang meliputi edema, vakuolisasi, dan fusi yang terjadi akibat adanya paparan pestisida berbahan aktif metomil. Acar *et al* (2002) menjelaskan bahwa flavonoid mempunyai komposisi 90% Diosi dan 10% hespiridin, dimana mempunyai efek meningkatkan vaskularisasi dan proteksi pada endotelium vascular yang sangat membantu dalam proses perbaikan sel sel yang rusak.

Flavonoid memiliki aktifitas antioksidan dan anti-inflamasi. pemberian flavonoid menurut Nijveldt *et al.*, (2001) dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang membuat radikal bebas menjadi inaktif sehingga menurunkan



kemampuannya dalam menarik mediator inflamasi, menghambat enzim siklooksigenase dan lipooksigenase, sehingga produksi prostaglandin dan leukotrien dapat berkurang. Trowbridge dan Emling, (1993) menjelaskan bahwa penurunan jumlah prostaglandin dan leukotrien mengakibatkan migrasi sel radang ke area jaringan yang rusak akan berkurang yang menandakan bahwa proses penyembuhan fase inflamasi dipersingkat, sehingga dapat segera memasuki fase proliferasi. Pada tahapan proliferasi, Taqwim *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa flavonoid mampu mengatur fungsi sel dengan cara merangsang produksi TGF- $\beta$  yang dapat meningkatkan kemotaksis dan proliferasi fibroblas di daerah luka yang mana semakin banyak fibroblas pada daerah luka, maka sintesis kolagen segera dimulai sehingga mempercepat proses penyembuhan. Sehingga dengan pemberian flavonoid pada ikan nila secara tidak langsung dapat mempercepat proses penyembuhan insang ikan nila yang rusak akibat adanya paparan pestisida berbahan aktif metomil.

## 5.9 Parameter Penunjang

Parameter fisika kimia air yang diamati pada uji toksisitas adalah Suhu, pH, DO dan Total Amonia Nitrogen.

### 5.9.1 Suhu

Menurut Kordi *et al* (2005), Suhu mempengaruhi aktivitas metabolisme, pertumbuhan dan kehidupan organisme, karena itu penyebaran organisme baik di lautan maupun di perairan air tawar dibatasi oleh suhu perairan tersebut. Pengukuran parameter suhu dilakukan karena merupakan parameter penting bagi kehidupan ikan. Rata-rata suhu selama pemaparan pestisida berbahan aktif metomil dapat dilihat pada tabel 13 dibawah.



**Table 13 Rata-rata suhu selama masa pemaparan pestisida berbahan aktif metomil**

KONSENTRASI (ppm)	RATA-RATA SUHU JAM KE (°C)			
	24	48	72	96
0	27.0	28.0	26.8	26.7
3.2	27.7	26.8	26.8	27.2
4.2	27.9	27.8	27.7	26.8
6.5	27.2	27.2	28.2	27.2
8.7	28.0	27.0	27.5	26.8
10	27.5	27.2	27.5	27.5

Berdasarkan tabel 13 di atas, rata-rata suhu pada masing masing perlakuan berkisar antara 26,7°C hingga 28.2 °C. Menurut Devlin (2002), suhu merupakan salah satu paramenter kualitas air yang paling sering dipelajari sebagai faktor lingkungan dalam perikanan. El-sayed (2017) menambahkan, suhu merupakan salah satu parameter kualitas air yang sangat penting bagi ikan. DeWalle *et al.*, (2011) mengemukakan bahwa suhu optimal untuk pertumbuhan ikan nila berkisar antara 25°C-27°C. berdasarkan literature tersebut dapat dikatakan suhu media pemeliharaan ikan nila selama masa pemaparan pestisida tergolong optimal untuk ikan nila.

### 5.9.2 Derajat Keasaman air (pH)

Menurut Rifai dan Nasution (1993), pH merupakan suatu ekspresi dari ion hidrogen ( $H^+$ ) di dalam air. Biasanya dinyatakan dalam minus logaritma dari konsentrasi ion H, Nilai pH ini sangat penting sebagai parameter kualitas air, karena mengontrol tipe dan laju kecepatan reaksi beberapa bahan di dalam air. Selain itu ikan dan makhluk-makhluk akuatik lainnya hidup pada selang pH tertentu, sehingga dengan diketahuinya nilai pH maka kita akan tahu apakah air tersebut sesuai atau tidak untuk menunjang kehidupan organisme air. Data pH media pemeliharaan ikan nila selama pemaparan pestisida berbahan aktif metomil dapat dilihat pada tabel 14 dibawah

**Table 14 rata-rata pH selama masa pemaparan pestisida berbahan aktif metomil**

KONSENTRASI (ppm)	RATA-RATA PH JAM KE (ppm)			
	24	48	72	96
0	6.0	6.3	6.0	6.7
3.2	6.7	6.3	6.7	6.3
4.2	6.7	6.7	6.0	6.3
6.5	7.0	7.0	7.3	7.0
8.7	7.0	6.7	7.3	7.0
10	6.7	6.3	7.3	6.7

Berdasarkan tabel 14 di atas, rata-rata pH pada masing masing perlakuan berkisar antara 6 hingga 7,3 .Menurut Setyo (2009), secara umum nilai pH air media pemeliharaan pada budidaya ikan nila antara 5 sampai 10 tetapi nilai pH optimum adalah berkisar 6 – 9. Berdasarkan literatur tersebut dapat dikatakan rata-rata pH selama pemaparan pestisida berbahan aktif metomil berada pada kisaran optimum. Menurut Kordi dan Tancung (2007) menyatakan bahwa dalam budidaya pada pH dengan nilai 5 masih dapat ditolerir oleh ikan tapi pertumbuhan ikan akan terhambat sedangkan pH pertumbuhan yang optimal berada pada kisaran 6,5 - 9,0. Menurut Asmawi (1983), derajat keasaman yang masih dapat ditolerir oleh ikan air tawar adalah 4.

### 5.9.3 Oksigen terlarut (DO)

Oksigen terlarut (DO) merupakan variable kualitas air yang sangat penting bagi ikan dimana parameter ini akan mempengaruhi system metabolisme dan kesehatan ikan. Perubahan konsentrasi oksigen terlarut dalam air baik di perairan mengalir atau tergenang dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik seperti kegiatan fotosintesis, peningkatan suhu dan berbagai faktor lain (Stiller, 2017). Data parameter oksigen terlarut pada media pemeliharaan ikan nila selama masa pemaparan pestisida berbahan aktif metomil dapat dilihat pada tabel 14 dibawah :

**Table 15. Konsentrasi DO Selama Masa Pemaparan Pestisida Berbahan Aktif Metomil**

KONSENTRASI (ppm)	KONSENTRASI DO JAM KE (ppm)			
	24	48	72	96
0	6.50	6.80	6.80	6.97
3.2	6.37	6.83	6.37	6.40
4.2	6.67	6.83	6.83	7.63
6.5	7.10	6.67	6.80	6.90
8.7	6.50	6.30	6.17	6.67
10	6.33	6.87	6.87	6.73

Berdasarkan tabel 14 di atas, rata-rata konsentrasi oksigen terlarut pada masing masing perlakuan berkisar antara 6,17 ppm hingga 7,63 ppm. Menurut Mohsen (2014), terdapat tiga tingkatan konsentrasi oksigen terlarut dalam perairan media pemeliharaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yaitu rendah (1.0 - 1.5 ppm), sedang (2.5 - 3.0 ppm), dan normal (6.0 - 6.5 ppm). Berdasarkan literatur tersebut, konsentrasi oksigen terlarut selama masa pemaparan pestisida berbahan aktif metomil tergolong dalam kategori normal.

#### 5.9.4 Total Amonia Nitrogen (TAN)

Total ammonia nitrogen (TAN) atau amonia total merupakan jumlah amonia yang terukur di perairan, yang terdapat dalam bentuk amonium dan amonia bebas yang tidak terionisasi. Hasil pengukuran TAN selama penelitian disajikan pada Tabel 16.

**Table 16 . Konsentrasi TAN (*Total Ammonia Nitrogen*) Media Pemeliharaan Selama Masa Pemaparan Pestisida Berbahan Aktif Metomil**

KONSENTRASI (ppm)	KONSENTRASI DO JAM KE (ppm)			
	24	48	72	96
0	0.0	0,02	0,06	0,05
3.2	0.0	0,03	0,02	0,10
4.2	0.0	0,02	0,03	0,01
6.5	0.0	0,04	0,01	0,06
8.7	0.0	0,03	0,05	0,04
10	0.0	0.01	0,12	0,14

Berdasarkan tabel 16 di atas, rata-rata konsentrasi oksigen terlarut pada masing masing perlakuan berkisar antara 0.00 ppm hingga 0.14 ppm. Walaupun demikian pada penelitian ini konsentrasi TAN selama penelitian berkisar antara 0,024 – 0,10 ppm masih dalam kisaran yang baik selama kadar amoniaknya tidak lebih dari 0,16 ppm.



## 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

- a)  $LC_{50}$  96 jam dari pestisida berbahan aktif metomil terhadap ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berada pada konsentrasi 3,06 ppm.
- b) Pemaparan Dosis  $LC_{50}$  96 jam dari pestisida berbahan aktif metomil terhadap ikan nila menyebabkan terjadinya penurunan kadar eritrosit, hemoglobin, dan hematokrit. Sedangkan leukosit dan frekwensi mikronuklei meningkat.
- c) Pemaparan Dosis  $LC_{50}$  96 jam dari pestisida berbahan aktif metomil menyebabkan terjadinya beberapa kerusakan terhadap histologi insang ikan nila berupa edema, vakuolisasi, dan fusi.
- d) Aktivitas antioksidan rumput laut coklat (*Sargassum* sp.), didapat nilai  $IC_{50}$  didapat sebesar 8,67 ( $\mu\text{g/ml}$ ).
- e) Pemberian dosis  $IC_{50}$  merupakan dosis terbaik flavonoid rumput laut coklat mampu lebih cepat menurunkan leukosit, frekwensi mikronuklei, kerusakan histologi insang ikan nila (edema, vakuolisasi, dan fusi) dan meningkatkan eritrosit, hemoglobin dan hematokrit ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

### 6.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas flavonoid terhadap ikan nila (*Oreochromis niloticus*) untuk menentukan dosis maksimal yang aman serta menentukan metode yang efektif dan efisien dalam pemberian flavonoid pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) serta penggunaan metode LC-MS MS untuk proses purifikasi flavonoid. Selain itu perlu dilakukan pembubukan dan formulasi ekstrak sargassum yang dicampur dengan pakan komersil.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abramson, J.L. & Vaccarino, V. 2002. Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch intern med* Vol. 162 No. 11, June 10, 2002. p:1286-1292.
- Acar T, Tcylidiz R, Vahapogxlu H, Karakayali S, Aydin R. 2002. Efficasnsy of micronized flavonoid fraction on healing in thermally injured rat. *Amal of Burns and Fire Disasters*. vol XV(1) March 2002.
- Affandi, R. dan U.M. Tang. 2002. *Fisiologi Hewan Air*. Riau: Uni press.
- Al-Sabti. K dan Metcalfe. C. D., (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *jurnal Mutation Research/Genetic Toxicology*. Volume 343. 121-135.
- Altinok I Dan Capkin Erol. 2007. Histopathology of Rainbow Trout Exposed to Sublethal Concentrations of Methiocarb or Endosulfan. *Journal of Toxicologic Pathology*, 35:405–410.
- Alvarez D, Vollmann EH, dan von Andrian UH. 2008. Mechanisms and Consequences Of Dendritic Cell Migration. *Journal of Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):325-42.
- Andersen, M., Markham, K.R. 2006. *Flavonoids*. New York: Taylor & Francis Group.
- Andersen, M., Markham, K.R. 2006. *Flavonoids; Chemistry, Biochemistry and Applications*. New York: Taylor & Francis Group.
- Anderson DP, Siwicki AK. 1993. Basic hematology and serology for fish health program. Paper presented in second symposium on diseases in asian aquaculture "Aquatic Animal Health and the Environment" Phuket Thailand 25-29 th Oktober. Oktober 1993;25-29
- Angka SL. 1990. The pathology of walking catfish, *Clarias batrachus*, infected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila*. *EFS*.
- Asmawi, A. 1983. *Aspek Biologi Pertumbuhan Dan Kebiasaan Makan Ikan Selar Kuning (Caranx leptolepis)*. Erlangga. Jakarta.
- Asri B Y, Denny R dan Lovita A. 2015. Pengaruh Pemberian Tepung Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Dalam Ransum Terhadap Nilai Hematologi Puyuh (*Coturnix japonica*) fase layer. *jurnal.unpad.ac.id*.
- Astawan, M. dan A. L. Kasih. 2008. *Khasiat Warna-Warni Makanan*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Attia A. 2009. Histological And Electron Microscopic Studies Of The Effect Of  $\beta$ -Carotene On The Pancreas Of Streptozocin (Stz) Induced Diabetic Rats. *Pakistan J Biol Sci*. 12: 303–315.
- Augusto D. S, L. G., Lieber, S. R., Ruiz, M. A., & de Souza, C. A (1997). Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to



organochlorides. *Journal of Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29 (1), 46-52.

- Bakoulia P , Karadima C, Rouvalis A dan Iliopoulou-Georgudaki J. 2008. Acute Toxicity Evaluation Of An Insecticide Used In Potato Cultures With The Use Of Bioassays. *Fresenius Environmental Bulletin*. by PSP Volume 17 – No 8a.
- Barnet Tim P., David W . Pierce, R. Saravana, Niklas Schneide, Dietmar Dommonge , dan M ojib Latif. 1999. Origins of the midlatitude Pacific decadal variability. *Geophysical Research Letters*, VOL. 26, NO. 10, PAGES 1453-1456, MAY 15
- Bastami, K. Darvish, Moradlou, A.H., Zaragabadi, A.M, S.V. Salehi Mir, M.M. Shakiba, 2009. Measurement of Some Haematological Characteristics of the Wild Carp. *Springer-Verlag London. Comp ClinPathol* 18:321–323
- Bernard, F.F., Joseph G.Z. and Jain, N.C. 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Isabel Palacio-Betancur, Jaime A. Palacio-Baena, dan mauricio camargo-Guerrero. 2009. Micronuclei test application to wild tropical ichthyic species common in two lentic environments of the low zones in Colombia. *Journal of Actual Biol* 31 (90): 67-77
- Bhat, S. V., B. A. Nagasampagi and S. Meenakshi. 2009. *Natural Products : Chemistry and Application*. Narosa Publishing House, New Delhi. India.
- Bhatia A, Kumar Y. 2013. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. *APMIS* 121(7):569-581.
- Blaxhall P.C. 1972. The Haematological assesment of the health of fresh water fish. A Review of Selected Literatur. *Journal Fish Biology*. 4:593-604.
- Blaxhall, PC and Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of fish biology*. 5: 771-781.
- Bond, C.E. 1979. *Biology of Fishes*. Saunders College Publishing. Philadelphia. 514 p. <http://www.fishpathology.com>. diakses pada Desember 2015.
- Bowman W.C., dan Rand M.J. 1980. *Textbook of Pharmacology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. P. 16.17-16.31.
- Bryce Steven M, Jing Shi, John Nicolette, Marilyn Diehl, Paul Sonders, Svetlana Avlasevich, Sarojini Raja, Jeffrey C. Bemis, dan Stephen D. Dertinger. 2010. High Content Flow Cytometric Micronucleus Scoring Method is Applicable to Attachment Cell Lines. *Journal Environ Mol Mutagen*. 2010 Apr; 51(3): 260–266.
- Camargo, M.M.P and Martinez, C.B.R. 2007. Histopatology of Gills, Kidney and Liver of a Neotropical Fish Caged in an Urban Stream. *Jurnal Neotropical Ichthyology*, 5(3):327-336
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J .2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J.Food Drug Analysis*, 10: 178-182.

- Chaouche T M, Haddouchi F, Ksouri R, Atik-Bekkara F,. 2014. Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association* 77. 302-307p
- Connel, D. W. dan Miller, G. J. 1995. *Kimia dan Otoksikologi Pencemaran*. Cetakan Pertama. Jakarta: Universitas Indonesia
- Connell. D. W., Qiming. J. Y dan Verma. V., 2016, Influence of exposure time on toxicity-an overview. *Jornal of toxicology* 355-356. 49-53p
- Corpuz, M. J. A. T., Osi, M. O. dan Santiago, L. A. 2012. Free radical scavenging activity of *Sargassum siliculosum* J. G. Agardh. *International Food Research Journal* 20(1): 291-297.
- Daniel. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). *jurnal Mulawarman Scientifie*, Volume 9, No 1.
- Das DK. 1994. Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol* 234:410–420.
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Ishiguro K, Suzuki K, Suzuki H, Koei Okazaki, Shibata D, Tanaka Y. 2010. Generation of pink flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirecting the flavonoid biosynthetic pathway from delphinidin to pelargonidin. *Jurnal Plant Biotechnology* 27, 375–383.
- David H. (2004). *Pesticide, veterinary and other residues in food*. Woodhead Publishing. ISBN 1-85573-734-5.
- De Silva, P. M. C. S.; Samayawardhena, L. A. 2002, Low concentrations of lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. *Ecotox. Environ. Safe.*, 53, 248-254.
- Devi Y dan Mishra A. 2013. Study Of Behavioural And Morphological Anomalies Of Fry Fish Of Fresh Water Teleost, *Channa Punctatus* Under Chlorpyrifos Intoxication. *International Journal Pharmasi Biology Science* 2013 Jan; 4(1): (B) 865 – 87
- Dewalle DR, Swistock BR, Sharpe WE. 2011. Episodic flow – duration analysis: assessing toxic exposure of brook trout (*Salvenius fontinalis*) to episodic increases in aluminium.. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f95-081#.WfMIZBLg97k>. Accessed 20 Aug 2017.
- Díaz-Resendiz K. J. G. dan Girón-Pérez M. I. 2014. "Effect of chlor-pyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)," *Revista Bio ciencias*, vol. 3, no. 1, pp. 59–64,
- Díaz-Resendiz K. J. G., Toledo-Ibarra G. A., dan Girón-PérezDíaz-Resendiz M. I., 2015. Modulation of Immune Response by Organophosphorus Pesticides: Fishes as a Potential Model in Immunotoxicology. *Journal of Immunology Research* Volume 2015, Article ID 213836, 10 pages

- Departemen Kesehatan RI. Ditjen PPM & PLP. 2001. Pedoman Ekologi dan Aspek Perilaku Vektor. Jakarta
- Diskanlut Jatimprov, 2015. Peluang pasar komoditas nila di amerika serikat. [Http://diskanlut.jatimprov.go.id/?P=560](http://diskanlut.jatimprov.go.id/?P=560). Diakses pada 30 desember 2016.
- Djojosumarto P., 2008, Pestisida dan Aplikasinya. Jakarta: PT. Agromedia Pustaka.
- Dolenec M, Kuzir S. 2009. Anatomy and histology of bony fish gills as a basis of their multiple roles. *Veterinarska Stanica*, 40 (4): 209–217.
- Doloksaribu R. 2009. Isolasi Senyawa Flavonoid Dari Daun Tumbuhan Harimonting (*Rhodomirtus tomentosa* W.Ait.). Skripsi. Departemen kimia fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam universitas sumatera utara. Medan.
- Doloksaribu, R, 2009, Isolasi Senyawa Flavonoid dari Daun Tumbuhan Harimonting (*Rhodomirtus tomentosa* W.ait), Skripsi, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Dupont.co.id, 2017. Pengendalian Efektif Hama Penggerek Tomat Hingga Stadia Telur. <http://www.dupont.co.id/produk-dan-layanan/perindungan-tanaman/budidaya-tomat/produk/lannate-pengendalian-hama-penggerek-buah-pada-tanaman-tomat.html>. Diakses pada 17 september 2017.
- Dutta, H. M.; Munshi, J. S. D.; Roy, P. K.; Singh, N. K.; Motz, L.; Adhikari, S. 1997, Effects of diazinon on bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) gills: scanning electron microscope observations. *Exp. Biol. Online*, 2, 1-11
- Elbially Z I, Ismail T, Abdelhady H D, El-Asely M A. 2015. Assessment of Genotoxic Effects of Pesticide Residues and Related Haemato-Biochemical Parameters on Farmed Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) in Kafrelsheikh Governorate, Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 2015, 44: 136-146.
- El-Gawad. E. A. A, Abbass A. A. dan Shaheen A. A., (2012), Risks Induced By Pesticides On Fish Reproduction. *The Global Journal of Fisheries and Aqua. Res.* - Vol. No. 5.
- Elsayed KNM, Kolesnikova TA, Noke A, Klöck G.. 2017. Imaging the accumulated intracellular microalgal lipids as a response to temperature stress. *Jurnal 3 Biotech*. 2017 May;7(1):41.
- Emrizal, Armon F, Riska Y, Kamal R, Nola R I, Adriani S, Reni Y, Farediah A, Hasnah M. S dan Dayar A. 2014. Cytotoxic Activities of Fractions and Two Isolated Compounds from Sirih Merah (Indonesian red betel), *Piper crocatum* Ruiz & Pav. *Jurnal Procedia Chemistry* 13 79 – 84.
- Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Bigatti MP, Bolognesi C, Cao J, De Luca G, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hadjidekova VV, Hrelia P,

Jaworska A, Joksic G, Krishnaja AP, Lee TK, Martelli A, McKay MJ, Migliore L, Mirkova E, Müller WU, Odagiri Y, Orsiere T, Scarfi MR, Silva MJ, Sofuni T, Surralles J, Trenta G, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A; HUMAN MicroNucleus project. 2003. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Jurnal Mutation Res.* 2003 Jan 10;534(1-2):45-64.

- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. 1986. *Kimia Organik*. Jilid 1. Edisi Ketiga. Penerjemah: Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Jakarta: Erlangga.
- Fulya Dilek Gökalp Muranlı, Utku Güner. 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Journal of Mutation Research*. 726. 104–108.
- Gallaughier PH, H Thorarensen and AP Ferrel. 1995. Hematocrit in Oxygen Transport and Swimming in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Respiration Physiology*. 102: 279-292.
- Gamal-Eldeen. A. M, Abo-Zeid. M. A. M., Ahmed. E. F., 2013. Anti-genotoxic effect of the *Sargassum dentifolium* extracts: Prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation. *Jurnal Experimental and Toxicologic Pathology* 65 . 27–34
- Gangar, S.C., R. Sandhir, A. Koul. 2010. Anti-clastogenic activity of *azadirachta indica* against benzo(a)pyrene in murine forestomach tumorigenesis bioassay. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 67: 381-390.
- Gao L., He C., Liu X., et al. The innate immune-related genes in catfish. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(11):14172–14202.
- Gardenware 2016. Aquaponics in a Nutshell. <http://www.gardenaware.com/aquaponics-system/>. Diakses pada 26 November 2016 pukul 20.50 WIB.
- Ghufran, M.H., Kordi, K. 2010. *Budidaya Ikan Lele di Kolam Ikan Terpal*. Lily Publisher, Yogyakarta
- Guengerich F. P., Shimada T. 1991 Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4:391–407
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org/>; diakses pada 15 February 2017.
- Güner U, Gökalp Muranlı FD. 2011. Micronucleus test, nuclear abnormalities and accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). *Turk J Fish Aquat Sci.* 2011;11:615–622
- Guo, X.B., 2006. *Environmental Health*. Peking University Medical Press, Beijing.
- Gupta SC, Kim JH, Kannappan R, Reuter S, Dougherty PM, Aggarwal BB. 2013. Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in



cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Exper. Biol Med.* ;236:658–671

- Hachfi, L., Couvray, S., Simide, R. 2012. Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on hypothalamic- pituitary – gonad – liver(HPGL) axis in fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 4(1): 14 – 30
- Halang, B. 2004. Toksisitas Air Limbah Deterjen Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Bioscientine*. 1 (1) : 39 – 49.
- Hamid Ahmed S.H., F.A. Mohamed Ahmed, I. M. Adam Mohammed and S.I. Mohamed Ali, 2013. Physical & Chemical Characteristics of Blood of two Fish species (*Oreochromis niloticus* and *Clarias lazera*). *World's Veterinary Journal*. 3(1): 17-20.
- Han X., Shen T., Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci*. 2007;8:950–988
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, Edisi ke dua, ITB, Bandung.
- Harikrishnan R., Kim M., Kim J., Balasundaram C., Heo M. 2011. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish Shellfish Immunol*. 30 964–971.
- Hariyadi, S., I.N.N. Suryadipura dan Bambang Widigdo. 1992. *Limnologi. Metoda Analisa Kualitas Air*. Fakultas Perikanan IPB. Bogor. 122 hal.
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Journal of Marine Environmental Research* 52 (3): 231-247.
- Hinton, D. E. and Lauren, D. J. 1990. Integrative Histopathological Approaches to Detecting Effects of Environmental Stressors on Fishes. In: *Biological Indicators of Stress in Fish*, Adams, S.M. (Ed.). *Journal of American Fisheries Society*, Bethesda,MD.
- Huanyang Wu dan Shihua Ding. 2016. Micronuclei and dyskaryosis of erythrocytes and oxidatives tress response with endosulfan exposure in topmouth gudge on *Pseudorasbora parva*. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*. 134(2016). 179–185.
- Husnah, M. 2009. Golongan Senyawa Antioksidan Ekstrak Kasar Buah Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) Berdasarkan Variasi Pelarut. SKRIPSI. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malang Malang.
- Ilhan Altinok dan Erol Capkin. 2007. Histopathology of Rainbow Trout Exposed to Sublethal Concentrations of Methiocarb or Endosulfan. *Journal of Toxicologic Pathology*, 35:405–410, 2007.
- Jawad, LA, Al Mukhtar MA, Ahmed HK. 2004. The Relationship Between Hematocrit and Some Biological Parameters of The Indian Shad *Temalosa ilisha*. *Journal of Animal Biodiversity an Concervation* 27:47-52.

- Jin. W, Zhang. W, Wang. J, Yao. J, Xie. E, Liu. D, Duan. D, dan Zhang. Q, 2014. A study of neuroprotective and antioxidant activities of heteropolysaccharides from six *Sargassum* species. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 67, June 2014, Pages 336–342
- Juniarti, D. Osmeli dan Yuhernita. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl- 2-pikrilhydrazyl) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara Sains*, 13 (1) : 50-54.
- Kadi, A. 2005. Beberapa Catatan Kehadiran Marga *Sargassum* di Perairan Indonesia. Bidang Sumberdaya Laut, Pusat Penelitian Oseanografi, LIPI, Jakarta. p. 1–12
- Kamrin A. Michael, 2000. *Pesticide Profile : Toxicity, Enviromental, Impact and Fate*. Boca Raton. New York. Lewis Publisher
- Kanimozhi K., Devaraju S., Vengatesan M. R., Selvaraj V., Alagar M. 2013. Studies on synthesis and characterization of surface modified mullite fibre reinforced epoxy nanocomposites. *High Perform. Polym.* 25, 658–667
- Kastoeni, M.T. 1985. Analisis Probit Pendugaan LD50 dan LC50 serta Metode perhitungannya menurut Busvine dan Nash. *Balithort*. Lembang. 59 hlm.
- Khairum H., Khairul Amri. 2012. *Pembesaran Nila Di Kolam Air Deras*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka.
- Khopkar, S.M. 2003. *Kimia Analitis*. Jakarta : UI-Press. Halaman 419.
- Kordi, K. M. G. H. 2000. *Budidaya Ikan Nila*. Dahara Prize. Semarang.
- Kordi, K. M. Ghufuran. 2010. *Budi Daya Ikan Nila di Kolam Terpal*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Kusriani, P. Widjanarko dan N. Rohmawati. 2012. Uji Pengaruh Sublethal Pestisida Diazinon 60 EC terhadap Rasio Konversi Pakan (FCR) dan Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Jurnal Penelitian Perikanan*. Universitas Brawijaya, Malang, 1(1) :36-42.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach., R. R. Miller., D. R. M. Passino. 1977. *Ichthyology*. John Wiley & Sons, Inc. United State of America.
- Laing KJ1, Hansen JD. 2011. Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol*. Dec;35(12):1282-95
- Lenny S. 2006. *Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoida dan Alkaloida*. Medan : Fak. MIPA. USU.
- Li, W., Cressy, M., Qin, H., Fulga, T., Van Vactor, D., Dubnau, J. 2013. MicroRNA-276a Functions in Ellipsoid Body and Mushroom Body Neurons for Naive and Conditioned Olfactory Avoidance in *Drosophila*. *Jurnal Neuroscience*. 33(13): 5821–5833.
- Li H, Jiang H, Gao X, Wang X, Qu W, Lin R, dan Chen J. 2008. Acute Toxicity Of The Pesticide Methomyl On The Topmouth Gudgeon (*Pseudorasbora*



parva) : mortality and effects on four biomarkers. *jurnal Fish Physiol Biochem.* Sep;34(3):209-16.

Lucky, Z. 1977. *Methods for The Diagnosis of Fish Disease*. Hoffenana. G.L. Amerind Publish Co. Put. Ltd. New Delhi.

Luo H, Ge L, Zhang J, Ding J, Chen R, Shi Z. 2016. Enhancing acetone biosynthesis and acetone-butanol-ethanol fermentation performance by co-culturing *Clostridium acetobutylicum*/*Saccharomyces cerevisiae* integrated with exogenous acetate addition. *Bioresour Technol* 200:111-20

Mahiuddin Zahangir Md., Farhana Haque, Golam Mohammad Mostakim, M. Sadiqul Islam, 2015. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Journal of Aquaculture Reports*. Volume 2, November 2015, Pages 91–96.

Majewska et al (2011)

Mansour, S.A., Heikal, T.M., Mossa, A.H. and Refaie, A.A . 2008. Toxic effects of five insecticides and their mixture on male albino rats. *J. Egypt. Soc. Toxicol.* Vol. 39: 85-94 July.

Marimuthu, T. Bala, MD. Dan Friedrich, HB. 2012. Structure of Three Related Diphosphorus Ligands: Highlighting the Significance of the Backbone. *Journal Of Chemical Crystallography*. Volume: 42 Issue: 3 Pages: 251-257.

Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoida*. Terjemahan Kosasi Padmawinata. Bandung: ITB Press.

Mawarti dan Ghofar (2014)

McKim, J. M. 1985. Early life stage toxicity tests. Pages 58–95 in G. M. Rand and S. R. Petrocelli, editors. *Journal of Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere, New York.

Meenakshi S, Gnanambigai DM, Mozhi ST, Arumugam M, Balasubramanian T. 2009. Total Flavonoid and in vitro antioksidant activity of two seaweeds of Rameshwaram Coast. *Global Journal of Pharmacology*. 3(2): 59-62.

Mehdinezhad N, Ghannadi A, dan Yegdaneh A, 2016. Phytochemical and biological evaluation of some *Sargassum* species from Persian Gulf. *Jurnal Research in Pharmaceutical Sciences*. 11(3): 243–249.

Meidiantie Soenandar,Ari Raharjo,Muanis Nur Aeni. 2010, *Petunjuk Praktis Membuat Pesticida Organik*. Agromedia Pustaka.

Meiyanto, E., Hermawan, A., and Anindyajati. 2012. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal for Cancer Prevention*,; 13(2):427-436

Meng. S. L., Chen. J. Z., Hu. G. H., Song. C., Fan. L. M., Qiu. L. P. dan Xu. P., (2014). Effects of chronic exposure of methomyl on the antioxidant system in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ecotoxicology and Environmental Safety* 101. 1–6.

- Meng. S. L., Qiu. L. P., Hu. G. D., Fan. L. M., Song. C., Zheng. Y., Wu. Wa., Qu. J. H., Li. D. D., Chen. J. Z., dan Xu. P., 2016. Effects of methomyl on steroidogenic gene transcription of the hypothalamic-pituitary-gonad-liver axis in male tilapia. *Jurnal Chemosphere* 165 : 152-162
- Meyers, T. R. and Hendricks, J. D. 1985. Histopatholgy. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications* (G.M.Rand and S.R. Petrocelli, eds.), Hemisphere Publishing Corp., Washington, DC, pp. 283-331.
- Moss B., 1980. *Ecology of Fish Waters*, Balckwell Scintific Publication, London.UK.
- Moyle, P. B. & J. J. Cech. 1988. *Fish an Introduction to Ichthyology* Second Edition. Prentice Hall, New Jersey.
- Muchtadi, D. 2013. *Pangan dan Kesehatan Jantung*. Alfabeta. Bandung.
- Naqvi G Z, Shoaib N and Ali M A. 2016. Genotoxic Potential of Pesticides in the Peripheral Blood Erythrocytes of Fish (*Oreochromis mossambicus*). *Pakistan J. Zool.*, vol. 48(6), pp. 1643-1648, 2016.
- Nilza, L. R., Ligia M.M.; Dense O.S, Rassia B. P., Celso V. N., Tania U. N., Benicio A. F. and Benedito P.F., 2003. Haematological and biochemical values for Nile liJapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in semi-intensive system. *Journal of Acta Scientiarum Biological Sciences*. Maringa. 2S (2): 385-389.
- Nur., dan Adijuwana. 1989. *Tehnik Pemisahan dalam Analisis Biologis*. PAU. Ilmu Hayat. IPB. Bogor.
- Osman GM, Koutb M, Sayed AH. 2010. Use of hematological parameters to assess the efficiency of quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaf extract in alleviation of the effect of ultraviolet -A radiation on African catfish *Clarias gariepinus*. *J. Photoch. Photobio. B*, 99: 1-8.
- Othmer. 1968. Seaweed Colloids. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 17: 763 784.
- Palacio-Betancur I, Jaime A. Palacio-Baena, Mauricio Camargo-Guerrero, 2009, Micronuclei Test Application To Wild Tropical Ichthyic Species Common In Two Lentic Environments Of The Low Zones In Colombia. *Actual Biol* 31 (90): 67-77.
- Patra. J. K., Rath. S. K. dan Jena. K., 2008. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Seaweed (*Sargassum* sp.) Extract: A Study on Inhibition of Glutathione-S-Transferase Activity. *Jurnal Biologi Turki* 32. 119-125.
- Peebles Diane R, 2016, *Tilapia Recommendations*. Monterey, California. <https://www.seafoodwatch.org/seafood-recommendations/groups/tilapia>. Diakses pada 8 desember 2016.
- Peter C. Blaxhall. 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish. *Journal of fish biology*. Volume 4, Issue 4 October 1972 Pages 593–604.

- Peter Moyle B. and Cech, JR. Joseph J. 1988. *Fishes An Introduction to Ichthyology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Purnamasari Y, M Hoesain, NT Haryadi. 2015. Efektivitas Insektisida Imidacloprid, Betacyflutrin, Thiametoxam Dan Metomil. Jurusan Agrteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Jember.
- Ramadhani Tarasandi Dian. 2013. Pengaruh Paparan Aerosol Cat Semprot Terhadap Frekuensi Pembentukan Mikronukleus Mukosa Mulut Pada Pengguna Cat Semprot. Laporan Hasil Karya Tulis Ilmiah. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Rao, J. V.; Begum, G.; Sridhar, V.; Reddy, N. C. 2005, Sublethal effects of monocrotophos on locomotor behavior and gill architecture of the mosquito fish (*Gambusia affinis*). *J. Environ. Sci. Heal. B*, 40, 813-825.
- Redha Abdi. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis., <http://repository.polnep.ac.id/>, diakses pada 30 Desember 2016.
- Robinson, J. 1973. Dynamic of pesticides residues in the enviroment. Dalam C.A. Edwards (ed). *Environmental Pollution by Pesticides*. Plenum. Press, London. 459 hal.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Binacipta, Jakarta.
- Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, 2006. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res*. 609:74–80.
- Salasia, S.I.O., D. Sulanjari., dan A. Ratnawati. 2001. Studi hematologi ikan air tawar. *Journal of Biologi* 2(12):710-723.
- Santoso, S. 1998. Toksisitas air limbah industri pulp proses soda terhadap benih ikan mas (*Cyprinus carpio* L). *Jurnal Universitas Sudirman* 2 (XIV):5-10.
- Sastrohamidjojo. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Cetakan Pertama, Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- ShunLong Meng, LiPing Qiu, GengDong Hu, LiMin Fan, Chao Song, Yao Zheng, WeiWu, JianHong Qu, DanDan Li, JiaZhang Chen, dan Pao Xu. 2016. Effects Of Methomyl On Steroidogenic Gene Transcription Of The Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver Axis In Male Tilapia. *jurnal Chemosphere* 165. 152-162.
- SNI 06-6989.11-2004 Metode Uji Kandungan pH. [sisni.bsn.go.id/index.php/sni\\_main/sni/detail\\_sni/6990](http://sisni.bsn.go.id/index.php/sni_main/sni/detail_sni/6990). Diakses pada 26 Desember 2016.
- SNI 06-6989.23-2005, Cara Uji Suhu dengan Termometer. [sisni.bsn.go.id/index.php?/sni\\_main/sni/detail\\_sni/7174](http://sisni.bsn.go.id/index.php?/sni_main/sni/detail_sni/7174). Diakses pada 26 Desember 2016.
- Snieszko SF. 1960. Microhematocrit as a Tool in Fishery Research and Management. *U. S. Wildl. Serv. Sci. Rep. Fish*. 341-15.

- Stirling, C., McAleer, M., Reckless, J. P. D., Campbell, R. R., Mundy, D., Betteridge, D. J. & Foster, K. 1985. Effects of acipimox, a nicotinic acid derivative, on lipolysis in human adipose tissue and on cholesterol synthesis in human jejunal mucosa. *Clin. Sci.*, 68, 83-84.
- Sukenda, I. Jamal, d. Wahjuningrum dan A. Hasan, 2008, Penggunaan Kitosan Untuk Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Lele Dumbo *Clarias sp.* *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 7(2): 159–169.
- Supriyono, E. 2005. Studi Toksisitas Insektisida Triklorfon terhadap ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Institut Pertanian Bogor. Jawa Barat.
- Tamat, S. R., T. Wikanta, dan L. S. Maulina. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau (*Ulva reticulata* Forsskal). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 5: 31-36.
- Tatiana da Silva S, dan Carmem S. F. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Jurnal Mutation Research* 605. 87–93.
- Trewavas, E. 1982. Tilapias: Taksonomi and Speciation, p. 3-14 In R.S.V Pullin and R.H. Lowe-McConnel (eds). *The Biology and Culture of Tilapias ICLARM. Conference Proceedngs, International Center For Living Aquatic Resources Management, Manila Philippines.*
- Vasconcellos, P.C., Souza, D.Z., Ávila, S.G., Araújo, M.P., Naoto, E., Nascimento, K.H., Cavalcante, F.S., Dos Santos, M., Smichowski, P., Behrentz, E., 2011. Comparative study of the atmospheric chemical composition of three South American cities. *Atmos. Environ.* 45, 5770-5777.
- Wade O. Watanabe, Thomas M. Losordo, Kevin Fitzsimmons dan Fred Hanley. 2012. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, dan Challenges. *Reviews in Fisheries Science*, 10:3-4, 465-498.
- Waji, R. A. dan Sugrani, A., 2009, Flavonoid (Quercetin), Laporan Kimia Organik Bahan Alam. Program S2 Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makasar.
- Wedemeyer GA and WT Yasutake. 1977. Clinical Methods for the Assessment of the Effect Environment Stress on the Fish Health. Technical Papers of the US Fish and Wildlife Service. US Depart of the Interior Fish and Wildlife Service. 89:1-17.
- Winarsi,H.2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Wing-Keong Ng dan Nicholas Romano. 2010. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Review in aquaculture*. Volume 5, Issue 4 December 2013 Pages 220–254
- Wing-Keong Ng and Nicholas Romano. 2013. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*. 4, 1–35

- Wudianto R., 2010. Petunjuk Penggunaan Pestisida. Penebar Swadaya, Jakarta
- Wudianto R., 2010. Petunjuk Penggunaan Pestisida. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Wulandari AS, Supriyanto. 2013. Teknik pangkas akar untuk meningkatkan produksi bibit melinjobermikoriza. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia.18(3): 167-171.
- Yosmaniar. 2009. Toksisitas niklosamida terhadap pertumbuhan, kondisi hematologi dan histopatologi juvenil ikan mas (*Cyprinus carpio*). Tesis. Sekolah Pascasarjana. IPB. Bogor.





## Lampiran

### Lampiran 1. Uji Penentuan Kisaran Konsentrasi Pestisida Berbahan Aktif Metomil


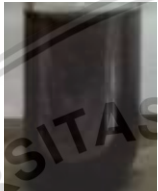
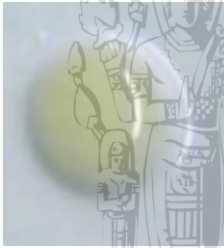
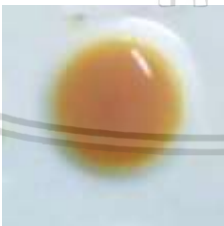

Konsentrasi	Ulangan	Jumlah ikan	Mortalitas jam ke								
			1	2	4	6	12	24	48	72	96
0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rata rata			0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.01	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rata rata			0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rata rata			0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	10	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	2	10	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Rata rata			0	0	0	0	0	0	0	2	2
10	1	10	0	0	2	2	3	4	10	10	10
	2	10	1	2	3	3	4	6	10	10	10
Rata rata			1	1	3	3	4	5	10	10	10
100	1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Rata rata			10	10	10	10	10	10	10	10	10



### Lampiran 2. Mortalitas Rata-Rata Ikan Nila Pada Uji Definitif

Konsentrasi	Jumlah Ikan	Mortalitas Jam Ke								
		1	2	4	6	12	24	48	72	96
0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.2	10	0	0	0	1	2	2	2	2	3
4.2	10	0	0	1	2	3	4	4	6	6
6.5	10	0	0	1	1	3	4	5	6	7
8.7	10	0	1	1	3	5	5	6	8	8
10	10	0	1	3	3	3	5	8	9	10



Lapiran 3. Hasil Uji Fitokimia Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.)

Jenis uji senyawa	Dokumentasi	Dugaan	Keterangan
flavonoid		+	Terjadi perubahan larutan menjadi kemerahan
tanin		+	Terjadi perubahan larutan menjadi kehitaman
Alkaloid		-	Tidak terbentuk endapan putih pada larutan
- Pereaksi Meyer		-	Tidak terbentuk endapan putih pada larutan
- Pereaksi Dragendrof			
saponin		-	Tidak terbentuk busa pada lapisan atas larutan

Terpenoid		+	Terjadi perubahan warna menjadi kecoklatan
Steroid		+	Terjadi perubahan warna larutan menjadi kehijauan

Lampiran 4. Analisis Statistik Aktifitas antioksidan sarrgassum

Konsentrasi (ppm)		Absorbansi			(%) aktifitas antioksidan			Rata-rata (%) aktifitas antioksidan	STD
		Ulangan			Ulangan				
	<i>blanko</i>	1	2	3	1	2	3		
0.25	1.133	1.109	1.089	1.104	2.1	3.9	2.6	2.85	0.918652
0.5		1.090	1.077	1.098	3.8	4.9	3.1	3.94	0.935458
1		1.089	1.081	1.079	3.9	4.6	4.8	4.41	0.467035
2.5		0.991	1.001	1.012	12.5	11.7	10.7	11.62	0.927093
5		0.879	0.849	0.890	22.4	25.1	21.4	22.98	1.872997

Lampiran 5. Analisis statistic Eritrosit Ikan Nila Setelah diinjeksi Flavonoid Sargassum

a. Data Eritrosit

Code Sampel	Ulangan			rata rata	STD
	1	2	3		
Control (-)	10.3	10.9	9.8	10.33	0.55
dosis a	11.9	11.6	11.5	11.67	0.21
dosis b	17.1	14.1	14.7	15.30	1.59
dosis c	25.2	27.0	28.7	26.97	1.75
Tanpa Perlakuan	31.0	28.9	31.9	30.60	1.54

## b. Deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol (-)	3	10.3333	.55076	.31798	8.9652	11.7015	9.80	10.90
dosis a	3	11.6667	.20817	.12019	11.1496	12.1838	11.50	11.90
dosis b	3	15.3000	1.58745	.91652	11.3566	19.2434	14.10	17.10
dosis c	3	26.9667	1.75024	1.01050	22.6188	31.3145	25.20	28.70
Tanpa Perlakuan	3	30.6000	1.53948	.88882	26.7757	34.4243	28.90	31.90
Total	15	18.9733	8.61232	2.22369	14.2040	23.7427	9.80	31.90

## c. Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1021.809	4	255.452	153.887	.000
Within Groups	16.600	10	1.660		
Total	1038.409	14			

## Lampiran 6. Analisis statistik Hematokrit Ikan Nila Setelah diinjeksi Flavonoid Sargassum

## a. Data Hematokrit

Code Sampel	Ulangan			rata rata	STD
	1	2	3		
Control (-)	18.0	19.0	17.0	18.00	1.00
dosis a	19.0	20.0	18.0	19.00	1.00
dosis b	20.0	18.0	21.0	19.67	1.53
dosis c	21.0	19.0	22.0	20.67	1.53
Tanpa Perlakuan	31.0	28.9	31.9	30.60	1.54

## b. Deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (-)	3	18.0000	1.00000	.57735	15.5159	20.4841	17.00	19.00
Dosis a	3	19.0000	1.00000	.57735	16.5159	21.4841	18.00	20.00
Dosis b	3	19.6667	1.52753	.88192	15.8721	23.4612	18.00	21.00
Dosis c	3	20.6667	1.52753	.88192	16.8721	24.4612	19.00	22.00
Tanpa Perlakuan	3	30.6000	1.53948	.88882	26.7757	34.4243	28.90	31.90
Total	15	21.5867	4.88480	1.26125	18.8816	24.2918	17.00	31.90

## c. Uji Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	315.984	4	78.996	43.709	.000
Within Groups	18.073	10	1.807		
Total	334.057	14			

## Lampiran 7. Analisis statistik Hemoglobin Ikan Nila Setelah diinjeksi Flavonoid Sargassum

## a. Data Hemoglobin

Code Sampel	Ulangan			Rata rata	Std
	1	2	3		
Control (-)	4.3	5.4	4.3	18.00	1.00
dosis a	5.0	5.2	5.4	19.00	1.00
dosis b	5.2	5.4	5.2	19.67	1.53
dosis c	6.2	5.0	6.0	20.67	1.53
Tanpa perlakuan	7.3	7.1	7.4	30.61	1.55

## b. Deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (-)	3	4.6667	.63509	.36667	3.0890	6.2443	4.30	5.40
Dosis a	3	5.2000	.20000	.11547	4.7032	5.6968	5.00	5.40
Dosis b	3	5.2667	.11547	.06667	4.9798	5.5535	5.20	5.40
Dosis c	3	5.7333	.64291	.37118	4.1363	7.3304	5.00	6.20
Tanpa Perlakuan	3	7.2667	.15275	.08819	6.8872	7.6461	7.10	7.40
Total	15	5.6267	.98522	.25438	5.0811	6.1723	4.30	7.40

## c. Uji Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.803	4	2.951	16.515	.000
Within Groups	1.787	10	.179		
Total	13.589	14			

Lampiran 8. Analisis statistic Leukosit Ikan Nila Setelah diinjeksi Flavonoid Sargassum

d. Data Leukosit

Code Sampel	Ulangan			rata rata	STD
	1	2	3		
Control (-)	3.42	3.32	3.62	3.45	0.15
dosis a	3.05	2.90	3.12	3.02	0.11
dosis b	2.25	2.50	2.31	2.35	0.13
dosis c	1.95	2.12	2.20	2.09	0.13
Tanpa Perlakuan	2.07	1.17	2.15	1.80	0.54

e. Deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (-)	3	3.4533	.15275	.08819	3.0739	3.8328	3.32	3.62
Dosis a	3	3.0233	.11240	.06489	2.7441	3.3025	2.90	3.12
Dosis b	3	2.3533	.13051	.07535	2.0291	2.6775	2.25	2.50
Dosis c	3	2.0900	.12767	.07371	1.7728	2.4072	1.95	2.20
Tanpa Perlakuan	3	1.7967	.54418	.31418	.4448	3.1485	1.17	2.15
Total	15	2.5433	.67102	.17326	2.1717	2.9149	1.17	3.62

f. Uji Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.573	4	1.393	19.063	.000
Within Groups	.731	10	.073		
Total	6.304	14			